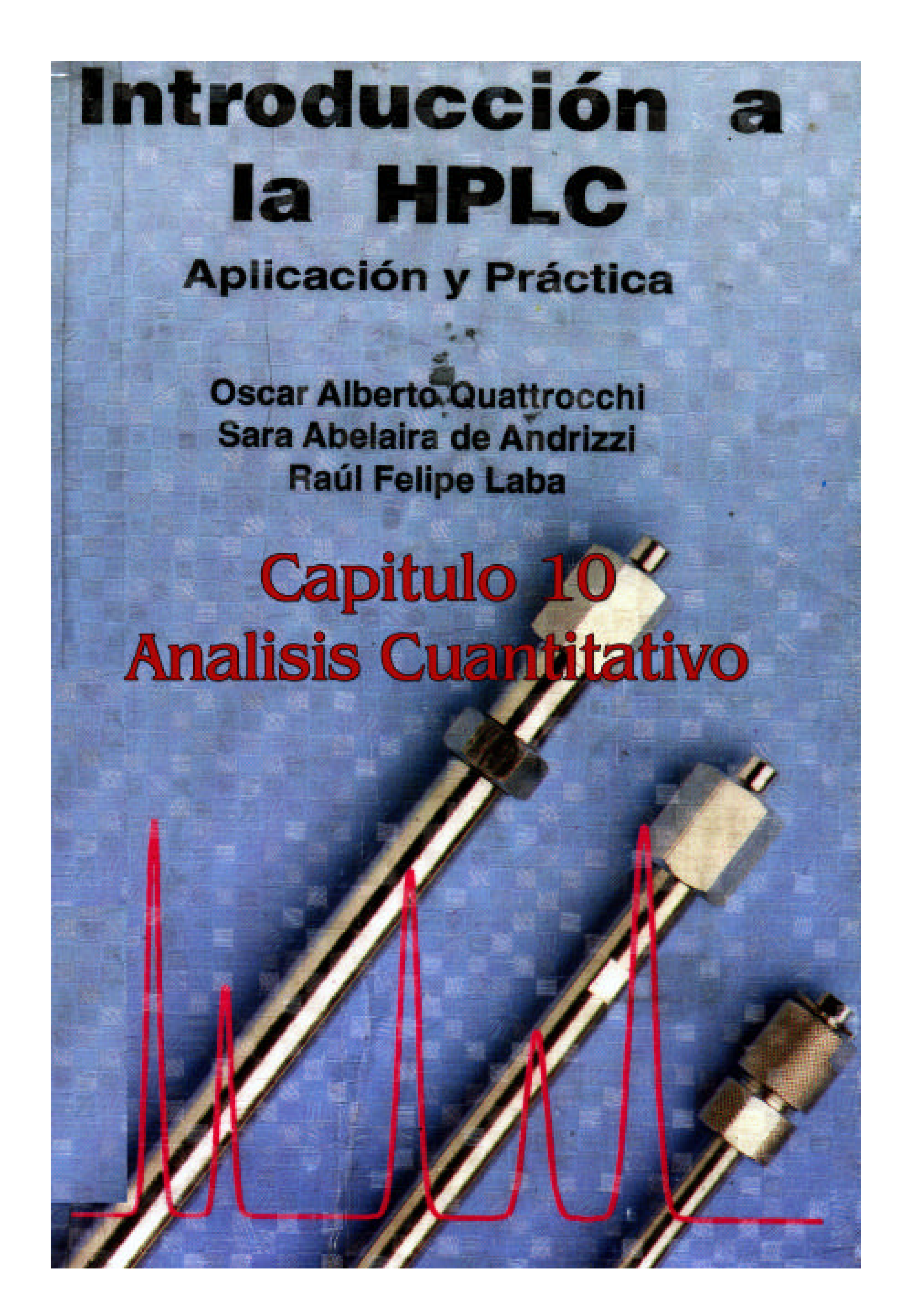


Introducción a
la HPLC
Aplicación y Práctica
Oscar Alberto Quattrocchi
Sara Abelaira de Andrizzi
Raúl Felipe Laba
Capitulo 10
Analisis Cuantitativo

Introducción a la HPLC

Aplicación y Práctica

Oscar Alberto Quattrocchi
Laboratorios Dr Gador, Buenos Aires
Argentina

Sara Inés Abelaira de Andrizzi
Laboratorios Farmerit, Buenos Aires
Argentina

Raúl Felipe Laba
Laboratorios Dr Gador, Buenos Aires
Argentina

Queda hecho el depósito que previene la ley

IMPRESO EN LA ARGENTINA
en Artes Gráficas Farro SA, California 2750/52,
(1289) Buenos Aires

Prefacio

Blacksburg, Virginia, USA

La Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) representa el mayor mercado en el mundo del instrumental analítico, con más de U$S 900.000.000 en 1990. La popularidad de esta metodología se debe a su gran versatilidad (ya que cubre un amplio espectro de aplicaciones), excelente capacidad para el análisis de trazas (en muchos casos ppb), rapidez y adaptabilidad al análisis cuantitativo. La HPLC se utiliza en casi todos los laboratorios industriales, organismos oficiales, universidades y en todos los laboratorios donde se realicen investigaciones químicas o bioquímicas. Las aplicaciones de HPLC (particularmente en el área de la biotecnología) se están incrementando rápidamente. En los años venideros la HPLC continuará jugando un rol predominante en los laboratorios de investigaciones farmacéuticas, de síntesis orgánica, bioquímicos, biológicos, de control del medio ambiente y alimentarios.

Aún por extraño que parezca una de las mayores limitaciones de HPLC es la falta de operadores experimentados. El entrenamiento en técnicas modernas de HPLC en las universidades es escaso, casi nulo. Esto ocurre debido al alto costo de los instrumentos y a que los profesores de otra generación no tuvieron la oportunidad de adquirir experiencia en esta disciplina, por lo cual el entrenamiento debe recaer o en el fabricante del instrumento o en el químico experimentado en la materia.

Es para mi un placer escribir el prefacio de este libro. En primer lugar considero que es un libro bien organizado, bien escrito y bien ilustrado, que será un texto esencial para químicos industriales, estudiantes universitarios e incluso algunos profesores universitarios.

El libro comienza con los fundamentos y contiene definiciones simples, gráficos apropiados para ilustrar los modelos de los mecanismos de separación, instrumental moderno y aplicaciones corrientes. Continúa luego con temas avanzados como la cromatografía de iones, la utilización del triángulo de solventes para el

desarrollo de los métodos de análisis, gráficos en tres dimensiones del detector de ordenamiento de fotodiodos, y la validación de los métodos analíticos. Me han sido particularmente gratas las extensas referencias y la utilización de gráficos originales de trabajos publicados (con la correspondiente autorización). El resultado es un libro bien balanceado, detallado y de fácil lectura.

Estoy muy complacido de escribir en este libro porque muchos de mis amigos latinoamericanos me han pedido durante años que les recomendara un buen libro sobre HPLC. Este es ese libro! Por favor, léalo y disfrútelo tanto como yo.

Cordialmente

Dr Harold M. McNair
Profesor de Química
Director de la Facultad de Química.
Politécnico de Virginia

Agradecimientos

Este libro no se hubiera podido crear sin la ayuda y el apoyo brindado por:
El Profesor Dr Harold McNair, Director del Departamento de Química del Virginia Polytechnic Institute and State University, quién gentilmente brindó su aporte escribiendo el prólogo.
Laboratorios Dr Gador y Laboratorios Farmerit, en particular al Dr Enrique Piccinni, el Dr Jorge Balla, el Lic. Julio Vega, el Sr Pablo Fernández, la Dra Marta Vidal, la Sra Patricia Cabaco, la Dra Dania Rosso Picot y el Sr Jorge Vidal.
Merck Química Argentina y E. Merck Darmstardt, RFA, en especial al Dr Luis Lautenschläger, el Dr Cezar Hoffmann, el Sr Roberto Campos y la Ing. Marina Pszenny.
Queremos destacar especialmente el apoyo y la comprensión brindados por nuestras familias y nuestros hijos: Silvana, Gabriela, Pablo Oscar, Natalia, Marina y Pablo Daniel, a quienes dedicamos nuestra obra.

Contenido

Capítulo 1

Introducción

Objetivos

La HPLC o Cromatografía Líquida de Alta Performance ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década del '70, y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea éste dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial, biológico o bromatológico.
Por medio de este libro intentamos introducir al técnico y profesional de la química analítica en esta metodología, basándonos en principios teóricos pero procurando intercalar ejemplos que faciliten su comprensión. Por definición del objetivo que nos movió a escribirlo, y por razones de extensión, se centralizó la atención en las modalidades habituales y más frecuentes de la HPLC, dejando de lado algunos métodos y aplicaciones particulares que demandarían un tratamiento más amplio. De cualquier modo, consideramos recomendable para todo analista ávido de profundizar en la metodología la consulta de la bibliografía indicada como referencia de cada sección y en las publicaciones especializadas, algunas de las cuales se citan más adelante en este capítulo.

La Cromatografía

Según define la IUPAC[1], "La Cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase

estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuída como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa". Una definición tan general como ésta puede sin embargo presentar restricciones, por ejemplo ante el desarrollo en la década del '60 de la SFC y la comercialización a partir de 1987 de cromatógrafos de fluídos supercríticos, en los cuales la fase móvil no es ni un gas ni un líquido, sino un fluído supercrítico. Quizás por ello sea conveniente, sólo relacionar la cromatografía con un método separativo y aceptar la definición de Guiddings: un "método de migración en zonas", abriendo la mente ante los cambios que continuamente se producen. La idea de la HPLC misma, siglas que se debieron a "High Pressure Liquid Chromatography" debieron ser cambiadas cuando los cromatografistas se dieron cuenta de que la presión sólo constituía una herramienta que forzaba a la fase móvil a atravesar la columna, sin constituirse por sí en una variable del sistema. Sin embargo, y ante la "universalidad" consumada del término "HPLC", se decidió simplemente buscarle otro significado, resultando "High Performance Liquid Chromatography".

Modalidades de la Cromatografía

A pesar de evitar las definiciones, es claro que las clasificaciones permiten un estudio más ordenado de tópicos. Así, clasificamos las modalidades cromatográficas en función de varios parámetros

- **La naturaleza de la fase móvil**. Si la fase móvil es un gas, la modalidad cromatográfica se denomina gaseosa (GC) y si es un líquido, cromatografía líquida (LC). A este último grupo pertenecen la cromatografía en capa delgada (TLC), la cromatografía líquida en columna abierta, y la cromatografía líquida de alta performance (HPLC). A pesar de las diferencias entre las distintas modalidades, los principios que gobiernan la separación son los mismos en todos los casos.
  La cromatografía gaseosa se emplea para separar mezclas que contienen compuestos orgánicos volátiles, pero suele presentar grandes dificultades si las sustancias a analizar no son volátiles, si descomponen a altas temperaturas o poseen alto peso molecular. Se ha estimado[2] que sólo un 20 % de las sustancias orgánicas conocidas puede separarse por GC sin tratamiento previo.
  La diferencia fundamental entre HPLC y GC se encuentra en el tipo de detectores y en la influencia de la fase móvil. En GC es muy simple encontrar detectores que diferencien la muestra de la fase móvil (un gas inerte). Esto no es tan simple en HPLC, ya que la fase móvil no sólo no es inerte sino que su masa es sensiblemente superior. Por ese motivo cualquier dispositivo que mida una propiedad física del soluto (conductividad térmica, ionización en una llama, captura de electrones) es apropiado

como detector de GC, pero resulta de difícil aplicación en HPLC (aunque llegaron a comercializarse algunos dispositivos de ionización de llama, aparentemente con poco éxito). En HPLC es necesario encontrar dispositivos que diferencien el soluto en solución de la fase móvil. Los más difundidos son los detectores UV y en menor proporción los de fluorescencia, el de índice de refracción y el electroquímico.
La otra diferencia fundamental entre la GC y la HPLC se refiere a la influencia de la fase móvil en la separación. En GC la fase móvil es un simple carrier del soluto y prácticamente no influye en la separación. El tipo de gas a utilizar se selecciona únicamente en función del detector a emplear. Por el contrario, en HPLC la fase móvil es el parámetro fundamental que gobierna la separación. En consecuencia, en GC se necesitan muchas columnas para abarcar el rango de separaciones posibles, mientras que en HPLC con una sola columna es posible separar sustancias polares, iónicas, ionizables y no polares simplemente modificando la composición de la fase móvil. Si bien la resolución puede ser mayor con los materiales actuales de HPLC, la eficiencia global es mayor en GC dado que la menor viscosidad de la fase móvil, un gas, permite usar columnas mucho más largas. Sin embargo, la selectividad aportada por la amplia variedad de solventes aptos para ser empleados como fase móvil en HPLC le otorgan mucho mayor versatilidad. La mayor deuda de la HPLC con el analista es, tal vez, la existencia de un detector altamente sensible y "universal".

- **La naturaleza de la fase estacionaria.** Si la fase estacionaria es un sólido y la fase móvil un líquido la cromatografía se denomina cromatografía líquido-sólido (LSC). Análogamente existirán una cromatografía líquido-líquido (LLC), gas-líquido (GLC) y gas sólido (GC).

- **El fenómeno que ocurre dentro de la columna.** Así, la cromatografía puede clasificarse en modalidades de afinidad y por tamaño molecular. Entre las primeras se encuentran la cromatografía en fase normal (capítulo 6), en fase ligada (capítulo 5), y la de intercambio iónico (capítulo 7). Entre las segundas se encuentran la GPC y GFC (capítulo 8). En las modalidades de afinidad el analito interactúa directa o indirectamente, a través del solvente, con la fase estacionaria, mientras que en las separaciones por tamaño molecular no existe (al menos teóricamente) ninguna interacción con la fase estacionaria.

- **La cantidad de muestra aplicada.** Si la cromatografía seleccionada para una separación no destruye la muestra (TLC, HPLC o columna abierta) es posible recuperar al analito separado de su matriz a la salida de la columna. Aumentando la cantidad de muestra es posible obtener desde microgramos hasta kilogramos de una sustancia pura en una sola corrida. Evidentemente las escalas de trabajo son diferentes, pero las bases que gobiernan a la separación son exactamente las mismas. Así es posible definir la cromatografía analítica en el rango de pg hasta µg, un rango semipreparativo que abarca desde los µg hasta los gramos y un rango preparativo, que

comprende las separaciones de analito mayores que el gramo. La cromatografía preparativa[3-5] constituye un campo específico dentro de la ciencia separativa, y su tratamiento está fuera del alcance de este libro. El lector interesado puede recurrir a la literatura especializada.

Formas de Cromatografía Líquida

Por su parte, y dado que nos ocupa en particular, podemos clasificar la cromatografía líquida de la siguiente forma:

- **Cromatograría Líquido-Sólido (LSC) o de adsorción.**
  Este método emplea una fase estacionaria polar, típicamente silicagel, y una fase móvil no polar, por ejemplo hexano, en general con el agregado de algún aditivo que provee selectividad.

- **Cromatografía Líquido-Líquido (LLC) o de partición.**
  En esta modalidad, las moléculas de soluto se distribuyen entre dos líquidos: uno es la fase móvil, y el otro la fase estacionaria, que se encuentra homogéneamente dispersa en un soporte sólido, finamente dividido. El desarrollo de este método le valió a Martin y Synge la obtención del premio Nobel de química de 1952. Sin embargo, varios inconvenientes, especialmente derivados del tipo de fijación de la fase estacionaria al soporte (meramente mecánica) se sumaron para que este método haya sido casi totalmente desplazado. Estos inconvenientes se debían a la necesidad de presaturar la fase móvil con fase estacionaria, la necesidad de disolver la muestra en fase móvil saturada con fase estacionaria, la imposibilidad de efectuar gradientes de elución, de programar caudales o temperatura para evitar el desprendimiento de fase estacionaria, etc. De todos modos, las columnas distaban mucho de ser estables, y los resultados reproducibles al nivel que hoy se pretende.

- **Cromatografía de Fase Ligada (BPC).**
  Las virtudes de la LLC eran claras, tanto como sus limitaciones. Por ello resulta también razonable pensar que reemplazando el tipo de unión de la fase estacionaria a su soporte, haciéndola perdurable por medio de una unión química covalente, el éxito del material estaría asegurado. Así, prácticamente el 90 % de las separaciones cromatográficas modernas se efectúa sobre material químicamente modificado, el cual permite optar, según el reactivo empleado para su fabricación, entre materiales

altamente hidrofóbicos o altamente hidrofílicos, con un amplio rango de polaridad y de selectividad: octadecilo, octilo, hexilo, butilo, etilo, ciano, diol, fenilo, amino, nitro, amonio cuaternario, resto sulfónico, etc.

- **Cromatografía de Intercambio Iónico (IEC).**
  En este caso se emplean rellenos en los cuales la partícula está consituída por un polímero o por silicagel, en cada caso unida a un grupo funcional aniónico o catiónico (típicamente sulfónico para el intercambio de cationes, amonio cuaternario para el intercambio de aniones). La selección del tipo de grupo funcional permite escoger entre intercambiadores débiles y fuertes.

- **Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC).**
  Esta modalidad emplea materiales de porosidad controlada, que funcionan como un filtro o tamiz y clasifica las moléculas de la muestra según un orden decreciente de tamaño molecular (las moléculas más grandes son las primeras en eluír, y las más pequeñas son las últimas). Si se dispone de estándares apropiados, de peso molecular adecuado (proteínas para el análisis de proteínas, dextranos para el ensayo de dextranos, etc), puede evaluarse el peso molecular de un compuesto desconocido, o bién la distribución de pesos moleculares de un polímero sintético.

Referencias Bibliográficas

A continuación señalamos un listado de referencias, que no pretende englobar la totalidad ni tampoco lo más representativo, pero que tienen a nuestro juicio la calidad y claridad necesarias para el objetivo propuesto.

Libros

* Snyder L., Kirkland J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2da. edición, J. Willey, N.Y., 1979.
* Unger K., "Packings and Stationary Phases y Chromatographic Techniques", M. Dekker, N.Y., 1990.
* Unger K., "Handbuch der HPLC", Git Verlag GMBH, Darmstardt, 1989.
* Engelhardt H., "Practice of High Performance Liquid Chromatography, Applications, Equipment and Quantitative Analysis", Springer-Verlag, Heidelberg, 1986.
* Scott R., "Liquid Chromatography Detectors", 2da. ed., Journal of Chromatography Library, vol. 33, Elsevier, Amsterdam, (1986).
* Wainer I., "Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development", Aster Pub.

Co., Springfield, 1985.
* Horváth C., "High Performance Liquid Chromatography, Advances & Perspectives", Accademic Press, N.Y., volúmenes 1 (1980) a 5 (1988).
* Snyder L., Glajch J., Kirkland J., "Practical HPLC Method Development", J. Wiley, N.Y., 1988.
* Ahuja S., "Selectivity and Detectability Optimization in HPLC", J. Wiley, N.Y., 1989.
* Berridge J., "Techniques for the Automated Optimization of HPLC Separations", J. Wiley, Chichester, 1985.
* Dolan J., Snyder L., "Troubleshooting HPLC Systems", Humana Press, Clifton, 1989.
* Runser D., "Mantaining and Troubleshooting HPLC Systems", J. Wiley, N.Y., 1981.

Revistas

* Analytical Chemistry, American Chemical Society, Washington DC, USA.
* CA Selects, (High Speed Liquid Chromatography, Gel Permeation Chromatography), Chemical Abstracts Service, Columbus, Ohio, USA.
* Chromatographia, Verlag Vieweg und Sohn, Wiesvaden, RFA.
* Journal of Chromatography, Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam, Holanda.
* Journal of Liquid Chromatography, Marcel Dekker, N.Y., USA.
* Journal of Chromatographic Science, Preston Publishers, Illinois, USA.
* Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications, Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, RFA.
* LC/GC International, Aster Publishing Corp., Eugene, OR, USA.

Referencias

1. IUPAC, "Recomendations on Nomenclature for Chromatography", Pure Appl. Chem. 37, 447, (1974).
2. Snyder L., Kirkland J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2da. ed., J.Wiley, N.Y., 1979.
3. De Stefano J., Kirkland J., Anal. Chem. 47, 1103A, (1975).
4. De Stefano J., Kirkland J., Anal. Chem. 47, 1193A, (1975).
5. Cretier G., Rocca J., Chimicaoggi, 17, Noviembre de 1986.

Capítulo 2

Instrumental

2.1 Introducción

El notorio avance que la cromatografía líquida moderna ha experimentado en los últimos años, en especial en lo referente al desarrollo de nuevas fases estacionarias, ha permitido al analista acceder a un nivel instrumental de alta precisión, compuesto por bombas que permiten entregar (en un solo instrumento) caudales muy estables que varían entre el microlitro y varios mililitros, detectores con celdas intercambiables en las cuales el volumen puede escogerse, generalmente entre 1 y 12 µl, válvulas accionadas por microprocesadores que permiten direccionar la fase móvil para automatizar procesos, integradores versátiles, aislados o conectados a una computadora que puede permitir no solo el control global de uno o más equipos cromatográficos sino la libre manipulación y almacenamiento de datos, generación de reportes e incluso el desarrollo automático de métodos, etc.

Básicamente, los equipos de HPLC pueden clasificarse **integrados** y **modulares**. En los

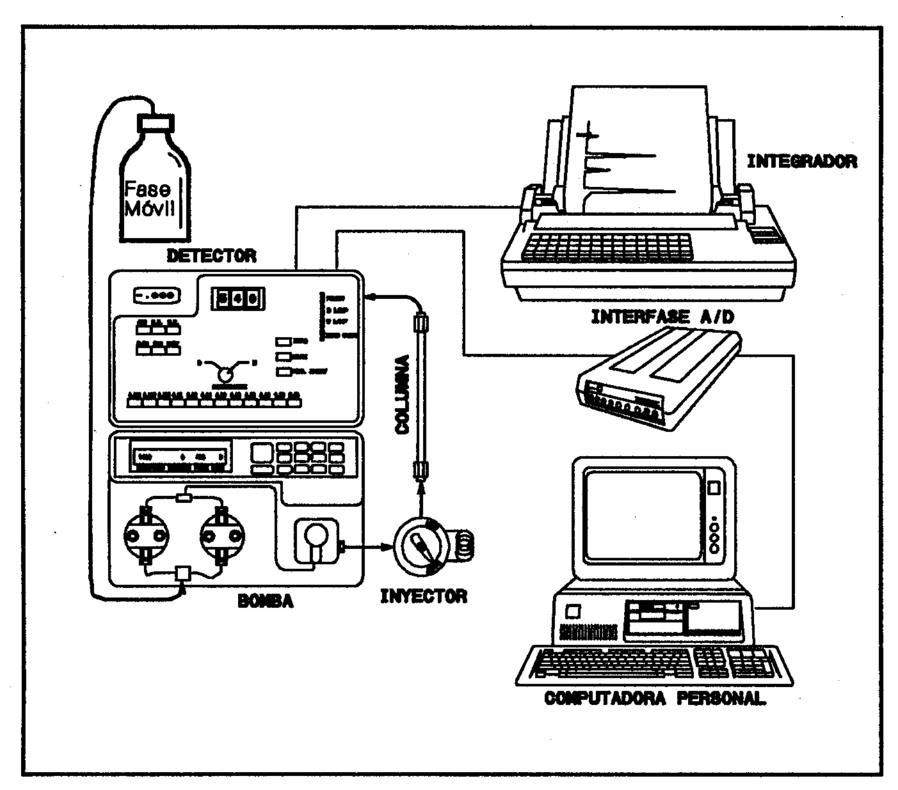


Fig. 2.1. Esquema de un cromatógrafo líquido básico modular.

primeros, cada una de sus partes (reservorio de solventes, bomba, inyector y detector) están reunidas en un gabinete y su intercambio o conexión con otros componentes de la misma o diferente marca es difícil. Permiten en cambio un mejor aprovechamiento del espacio, menos cables, tuberías y conexiones expuestas y quizás menores riesgos frente a operadores ocasionales o poco experimentados. En los segundos, los módulos son instrumentos individuales que permiten no solo armar el equipo según la necesidad del analista sino aumentar su complejidad según esa necesidad varíe. Esta conformación es además una buena defensa ante el "síndrome de la caja negra". Dicho de otro modo, la visualización de cada componente permite no solo el mejor conocimiento y control visual del equipo, sino el mejor aislamiento y resolución de problemas cuando estos se producen.
La figura 2.1 corresponde a un esquema, donde se representa un cromatógrafo líquido básico, de tipo modular.

2.2 Reservorio de la fase móvil

El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil. Puede ubicarse "dentro de la caja negra" de un equipo integrado o externamente en un equipo modular, y en general algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo llenas las conexiones.
Puede emplearse como reservorio de fase móvil cualquier frasco de laboratorio de buena calidad (de vidrio o polímero resistente), con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema. Es incluso una práctica corriente el empleo del mismo envase comercial en que se expenden los solventes, a cuya tapa se practican algunos orificios, al menos uno para el tubo de salida y otro para venteo, y simplemente se intercambia el frasco de solvente al agotarse el que está en uso.
Al extremo del tubo de salida de solvente se conecta un filtro de acero (buzo) con 2 o 10μm de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba. La capacidad del frasco depende, lógicamente, del consumo esperado: pocos mililitros en el modo microbore, 0.5 a 1 litro o más en los métodos convencionales y hasta varios litros en cromatografía preparativa.
Los sistemas que necesitan procesos de desgasificación contínua (ver sección 4.5) están provistos de una tapa especialmente diseñada para tal fin, en la cual podemos encontrar un orificio para la entrada del gas inerte de desgasificación, otro para la salida del solvente y una válvula que permite una presión positiva del gas sobre el solvente venteando el exceso.

2.3 Tuberías

La fase móvil empleada en HPLC debe circular por tuberías que conectan el reservorio de solvente con la bomba, la bomba con el inyector, éste con uno o más detectores conectados en serie, y eventualmente con un colector de fracciones o válvulas de distribución. Es evidente que estas tuberías deberán ser inertes, y de acuerdo a su ubicación en el sistema cromatográfico, resistentes a altas presiones. Así, se emplean tubos de acero inoxidable (316 o 304) o poliméricas (polipropileno o teflón) siendo las tuberías de acero 316 y la de teflón las más comúnmente utilizadas. Las tuberías de acero se utilizan para conectar los componentes sometidos a alta presión (entre bomba e inyector, inyector y columna, columna y detector y entre detectores conectados en serie) y los materiales poliméricos para conectar los componentes donde la presión es atmosférica o ligeramente superior (reservorio de solvente - bomba, último detector - frasco de desperdicios).

Las tuberías de acero tienen un diámetro externo estandarizado: 1/16 pulgadas. Sin embargo su diámetro interno es variable y se selecciona la de sección más fina para conectar los instrumentos por los cuales circula la muestra (entre inyector y detector, de modo de no provocar dilución de la muestra) y la de sección más gruesa para conectar aquellos componentes del sistema por los que no circula la muestra, y en los cuales un diámetro interno delgado sólo aumentaría la presión del sistema. Las conexiones por

Características de las columnas				**Largo máximo (cm) para un incremento de un 5% en el ancho de banda**		
				Diámetro interno de la tubería		
L (mm)	**ID** (mm)	**dp** (µm)	**N**	0.18 mm	0.25 mm	0.50 mm
33	4.6	3	4400	22	9	*
50	4.6	3	6677	33	14	*
100	4.6	3	13333	67	27	*
150	4.6	5	12000	167	68	*
250	4.6	10	10000	556	228	14
250	4.6	5	20000	278	114	*
250	2.0	5	20000	50	20	*
250	1.0	5	20000	12	*	*

Tabla 2.I Guía de la longitud de tubería -entre inyector y detector en función de las características de la columna (L = longitud de la columna, ID = diámetro interno dp= diámetro de la partícula, N = número de platos teóricos, determinados a un caudal de 1 ml/min, excepto de (a) 0.2 ml/min y (b) 0.05 ml/min, (*) = menos de 8 cm (de referencia 1 con permiso del editor).

donde no circula la muestra son de diámetro interno entre 0.5 y 0.7 mm, y aquellas por donde circula la muestra son de hasta 0.2 mm (sección 3.4).
Otro parámetro a considerar es la longitud de las tuberías ya que tuberías demasiado largas conducen a ensanchamientos extracolumnares importantes. Las conexiones entre bomba e inyector y posteriores al detector no contribuyen al ensanchamiento de banda extracolumnar y su efecto es menos importante. La tabla 2.I muestra las longitudes de tubería recomendadas en función de la longitud de la columna a utilizar, tamaño de partícula y número de platos teóricos. Nótese que para la tubería de 0.18 mm ID prácticamente no existen limitaciones en cuanto a su longitud aún utilizando las columnas más cortas o más angostas, mientras que la tubería de 0.5 mm ID se encuentra muy limitada en todos los casos.

2.4 Uniones

Las uniones permiten conectar las tuberías, y con ellas, los distintos componentes del sistema cromatográfico. Una unión consiste en dos piezas de acople perfecto, la unión "macho", consistente en una férula que se afirma a la tubería conectora y un tornillo (ver figura 2.2) que se ajusta a la unión "hembra", presente en un conector o componente de un módulo, dejando un volumen interno libre al solvente prácticamente nulo (zero dead volume o volumen muerto cero). Al fabricar una unión, la férula queda fijada a la tubería al realizar el primer ajuste y luego no se puede mover (ver figura 2.3).
Básicamente, existen dos tipos de uniones, las que hemos descrito, llamadas **convencionales** y las **universales**, en las cuales la férula está constituída por un polímero deformable y el tornillo posee una cabeza algo mayor y fresada, de manera de permitir el ajuste manual de la unión, a diferencia de las convencionales que necesitan del empleo de llaves apropiadas. Las uniones universales resultan mucho más cómodas que las convencionales, aunque pueden estar limitadas por la menor presión de trabajo (en general menor de 4000 psi).
Las uniones deben reunir determinadas características, entre ellas:

- deben ser inertes a fases móviles y muestras.
- deben cerrar herméticamente.
- no deben contribuir en forma notable al ensanchamiento de banda extracolumnar por la presencia de volúmenes muertos.

La figura 2.2 muestra una conexión convencional de HPLC formada por una unión macho (férula y tornillo) y un conector hembra. En general las uniones de diferentes fabricantes no son intercambiables entre sí dado que la longitud de tubería X es variable según las

diferentes marcas. Por otra parte, puede variar el ángulo de contacto entre férula y unión hembra así como el paso del tornillo, aún dentro de la misma medida.
La selección incorrecta de los conectores y el mal ajuste férula-tubería puede llevar a complicaciones, algunas de las cuales se esquematizan en las figuras 2.4.a) y b). En el primer caso, se produce pérdida de fluido por mal asentamiento de la férula, y en el segundo, un volumen muerto por distancia X inadecuada. En ambos casos, el usuario puede intentar el ajuste excesivo de la unión, lo que lleva casi invariablemente a la rotura de la cabeza del tornillo.

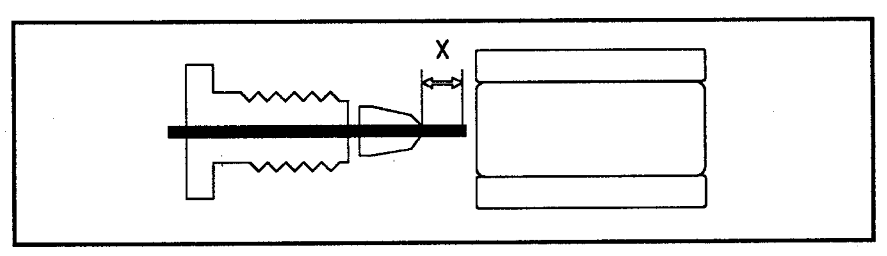


Fig. 2.2 Esquema de una unión "macho" - "hembra".

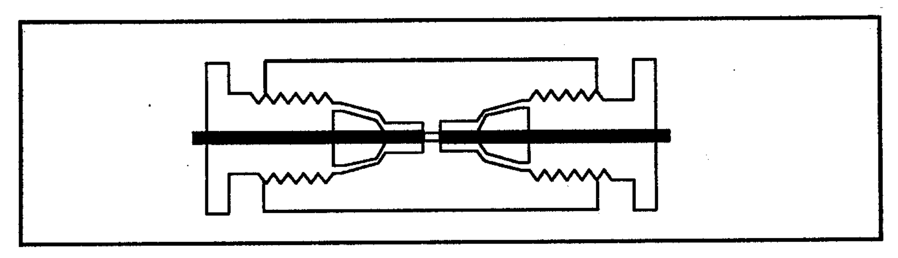


Fig. 2.3 Esquema de una unión de volumen muerto cero.

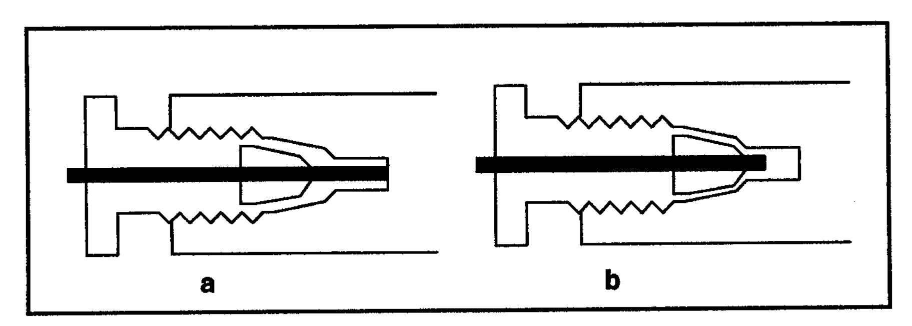


Fig. 2.4 Esquemas de uniones con defectos a) mal asentamiento de la férula y b) distancia X inadecuada.

2.5 Bomba

Las bombas de HPLC impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna. Su caudal de trabajo puede ser muy variable, según la escala de trabajo escogida. Existen bombas capaces de entregar caudales muy pequeños, del orden de los microlitros/minuto para la cromatografía microbore, pasando a caudales de unos pocos mililitros/minuto para la cromatografía analítica convencional hasta valores mucho mayores para las separaciones semipreparativas y preparativas.
Básicamente existen dos tipos de bomba: las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo (bombas jeringa). Las primeras son las de uso más difundido; son muy versátiles y fáciles de adaptar a la rutina del laboratorio. Las segundas no emiten pulsos en la entrega del solvente.

Materiales de Construcción

Las bombas están construidas de materiales muy resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico. Los componentes en contacto con el solvente son acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón. En general el acero inoxidable se utiliza como "cuerpo" de toda bomba, para la construcción de tuberías, conectores y cabezales de los pistones. Cuando el acero inoxidable resulta incompatible con el tipo de muestra (típicamente las de origen biológico en las cuales se desea conservar la "actividad biológica"), debe ser reemplazado por titanio.
Habitualmente los pistones están construidos de zafiro y las válvulas de retención (tanto las de entrada como las de salida de los cabezales de bombeo) por una pequeña esfera de rubí que apoya en un asiento de zafiro y una malla o retentor de acero inoxidable que retiene la esfera en sus movimientos.

Características de las bombas

Las bombas de HPLC tienen las siguientes características:

1. **Caudal.** Los equipos convencionales operan con caudales entre 0.1 y 10.0 ml/min y trabajan con presiones de hasta 6000 psi. Las bombas que se utilizan con columnas microbore operan en el rango de 0.01 a 0.5 ml/min y las que se utilizan con columnas preparativas en rangos mayores, dependiendo de la escala operativa.

2. **Exactitud en el caudal.** La exactitud en la medición del caudal se refiere a la divergencia entre el caudal de trabajo establecido y el caudal real entregado. Puede determinarse fácilmente midiendo el volumen de líquido entregado en un intervalo de tiempo preestablecido. La importancia de la exactitud en el caudal reside en la importancia que pueda darse a la exactitud en la determinación de los tiempos de

retención de las sustancias a cuantificar, parámetro que no es importante en muchos casos.

3. **Ruido.** El ruido (short-term) se refiere a las variaciones denominadas pulsaciones que presentan las bombas del tipo reciprocante, y que conducen a variaciones en el caudal de solvente entregado en intervalos cortos de tiempo. Se origina en la detención (en intervalos de tiempo muy breves) del caudal de líquido durante los movimientos habituales de la bomba (apertura-cierre de válvulas o movimiento de los pistones). A pesar de que cierto nivel de ruido es habitual, deficiencias en el sistema de bombeo como válvulas tapadas, burbujas de aire ocluidas en los cabezales o sellos en mal estado intensifican notoriamente su valor. Estas inestabilidades pueden deberse a un mal funcionamiento de las válvulas de retención, tanto a la entrada como a la de salida de los cabezales de bombeo, la precipitación de sustancias de la fase móvil estanca en el equipo o de las muestras, a la aparición de burbujas de aire. Este parámetro es de importancia crucial para asegurar resultados cuantitativamente válidos debido a que las áreas de los picos de HPLC varían cuando varía el caudal de solvente. Asshauer y Ullner[2] han reportado que una variación de 5 % en el caudal de solvente produce una variación semejante en la medida del área del pico. Estos autores demostraron que se obtienen precisiones analíticas apropiadas cuando la precisión de la bomba no supera al 0.5 %.

4. **Deriva.** La deriva es un cambio continuo (positivo o negativo) en la entrega de solvente que se produce en intervalos de tiempo muy largos (típicamente durante horas). La deriva en el caudal conduce a diferencias en las áreas de los picos durante operaciones automáticas en períodos de tiempo muy largos (por ejemplo toda la noche). Para minimizar el efecto de la deriva sobre los resultados cuantitativos se suele efectuar una nueva calibración del instrumento con estándares apropiados luego de la inyección de cada serie de 5 ó 10 muestras.

5. **Sistema de corte.** Es conveniente que la bomba posea sistemas de corte de caudal cuando se superen valores límites de presión tanto superior como inferior. Este sistema de corte evita, en el primer caso, que excesos en la presión del sistema cromatográfico pueda dañar los componentes más sensibles como columnas y celda de los detectores. En el segundo caso permite detectar las posibles pérdidas de solvente o la incorporación de burbujas de aire al agotarse la fase móvil. Estos sistemas pueden tener una importancia vital si se utilizan equipos automáticos sin la ayuda de operador.

Bombas reciprocantes

En la actualidad la mayor parte de los equipos cromatográficos utilizan bombas con pistones de tipo reciprocante. Existen varios tipos de bombas reciprocantes: de un solo pistón, de dos pistones, de tres pistones, bomba tándem, y bomba a pistón y diafragma.

En la figura 2.5 se esquematiza un cabezal de bombeo de este tipo de bombas, y se pueden observar las distintas partes que lo conforman: pistón, válvulas de entrada y de salida. El pistón se conecta al motor del equipo por medio de engranajes, y en su movimiento hacia adelante impulsa el solvente despegando una esfera de rubí de su asiento de zafiro, y abriendo de esta forma la válvula de salida. La esfera es retenida por una malla de retención al tiempo que el solvente es impulsado hacia el sistema. Simultáneamente, la presión generada actúa sobre otra válvula, la de entrada, en la cual la esfera de rubí es

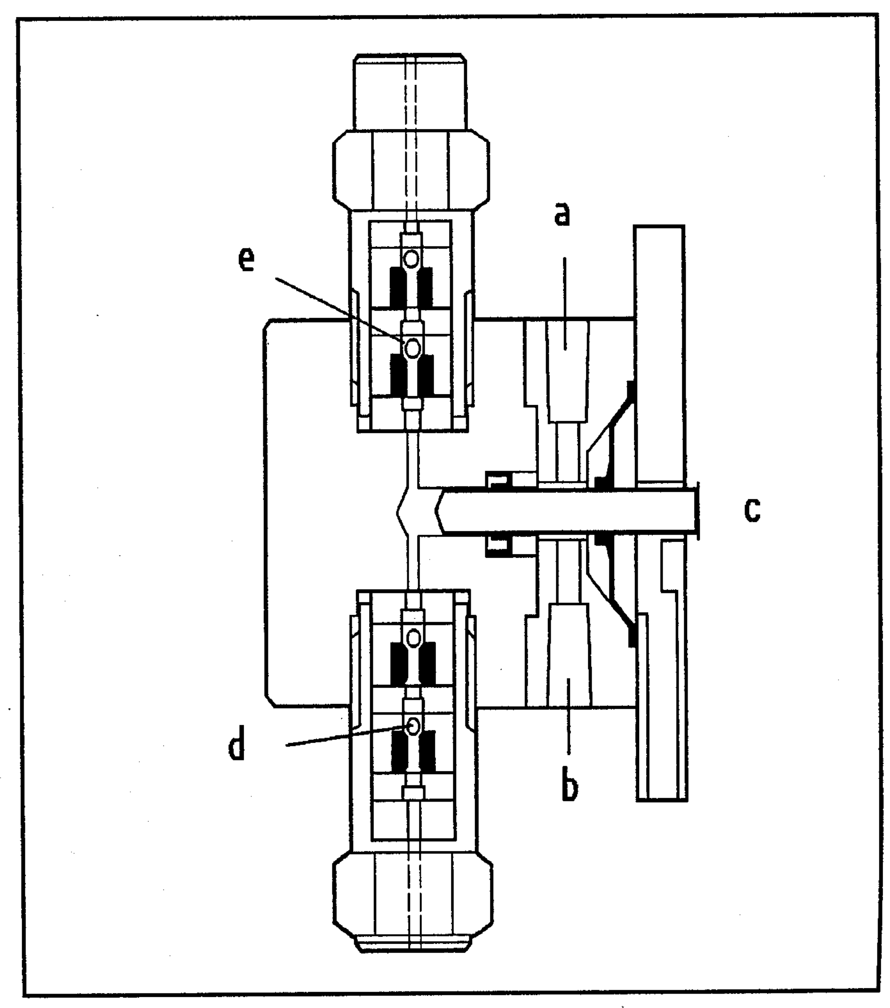


Fig. 2.5 Esquema de un cabezal de bombeo de una bomba reciprocante, a) y b) entrada y salida de solvente de limpieza del pistón, c) pistón, d) y e) válvulas de entrada y salida. Gentileza de LKB Instruments Inc.

forzada a ubicarse en el asiento de zafiro. Cuando el pistón retrocede por el mecanismo inverso se cierra la válvula de salida y se abre la de entrada permitiendo que el solvente proveniente del reservorio llene la cámara del pistón. Normalmente la válvula de entrada se ubica en la parte inferior y la de salida en la parte superior del cabezal de la bomba. Este diseño permite que las burbujas que accidentalmente entren al sistema sean fácilmente eliminadas.
Las bombas reciprocantes permiten variar el caudal entregado por alguno de los siguientes mecanismos:

1. variando el recorrido del pistón
2. variando la velocidad de movimiento del pistón

El volumen de la cámara del pistón es pequeño, normalmente entre 35 y 400 µl. Este volumen permite cambiar fácilmente la fase móvil, y disminuye el tiempo de demora para hacer efectivo un cambio de la composición de solvente durante un gradiente de elución. La unión entre el cabezal de la bomba y el pistón se efectúa por medio de una junta de material inerte (grafito o teflon) llamada sello, que facilita el desplazamiento del pistón y evita la pérdida de fase móvil. Como el cierre no es perfecto, algo de fase móvil puede desplazarse hacia el equipo. Las fases móviles constituidas por solventes puros no causan problemas, pero las soluciones salinas pueden producir depósitos por evaporación. Estos depósitos pueden rayar los sellos o los mismos pistones, por lo cual es recomendable lavar el sistema con un solvente apropiado luego de emplear fases móviles salinas. Algunos equipos disponen incluso de mecanismos que permiten enjuagar los pistones mientras trabajan (ver figura 2.5).
La bomba de un solo pistón es el modelo más sencillo de las bombas reciprocantes. Esta bomba impulsa a la fase móvil en ciclos alternados dados por los ciclos de llenado y vaciado de la cámara de bombeo (figura 2.6). En uno de los ciclos el pistón entrega el solvente contenido en la cámara y en el ciclo complementario cierra su comunicación con la columna y toma solvente del reservorio. Es evidente que cuando la bomba llena la cámara del pistón, el caudal se discontinúa. Este proceso se visualiza como un pulso, evidentemente indeseable ya que durante este ciclo no circula fase móvil. Este inconveniente puede reducirse de varios modos de costo y eficiencia variables:

- Empleo de atenuadores de pulso, consistentes en una cámara flexible que se coloca luego del pistón. Esta cámara se llena y entrega (como un acumulador) el solvente acumulado cuando no recibe solvente del pistón.
- Empleo de engranajes no circulares (excéntricos), de modo que el ciclo de llenado de la cámara del pistón sea más rápido que el de expulsión de la fase móvil que contiene.
- Empleo de dos o más pistones de funcionamiento sincrónico. En el caso más simple, cuando un pistón llena su cámara el restante entrega solvente, y cuando el primero entrega solvente, el segundo llena su cámara.

La figura 2.6 (a) muestra la entrega de solvente por parte de una bomba de un sólo pistón. Son aquí evidentes las discontinuidades en la entrega de solvente, mejorados en (b) por

empleo de dos pistones que trabajan en paralelo (fase de 180°). En este caso, los pistones están montados sobre engranajes individuales pero movidos por un sólo engranaje central que provee el sincronismo. Sistemas más sofisticados emplean incluso tres pistones en fase de 120°, y representan una alternativa más precisa y costosa.
Otra alternativa para la reducción de pulsos está dada por la bomba Tándem. Esta bomba contiene un cabezal con dos pistones de diferente tamaño, movidos a distinta velocidad. Por ejemplo, el pistón inferior es de mayor diámetro y se mueve al doble de velocidad que el superior. Cuando el pistón superior entrega solvente, el inferior llena su cámara con fase móvil. Cuando el pistón superior retrocede para llenar su cámara, el inferior impulsa la fase móvil, tanto hacia la cámara superior como hacia la columna. Esta alternativa sumada al empleo de atenuadores de pulso representa una alternativa más económica que la bomba de dos pistones reales, y en muchos casos aún efectiva.

Bomba a diafragma

La bomba a diafragma es un tipo particular de bomba reciprocante. En lugar de pistón, contiene un diafragma que separa el mecanismo de la cámara de bombeo. El diafragma está constituido por un material flexible, en general acero inoxidable o PTFE.
El solvente llega a la cámara impulsado por una bomba de baja presión, a través de la válvula de entrada. Luego, un pistón bombea aceite que presiona sobre el diafragma, el

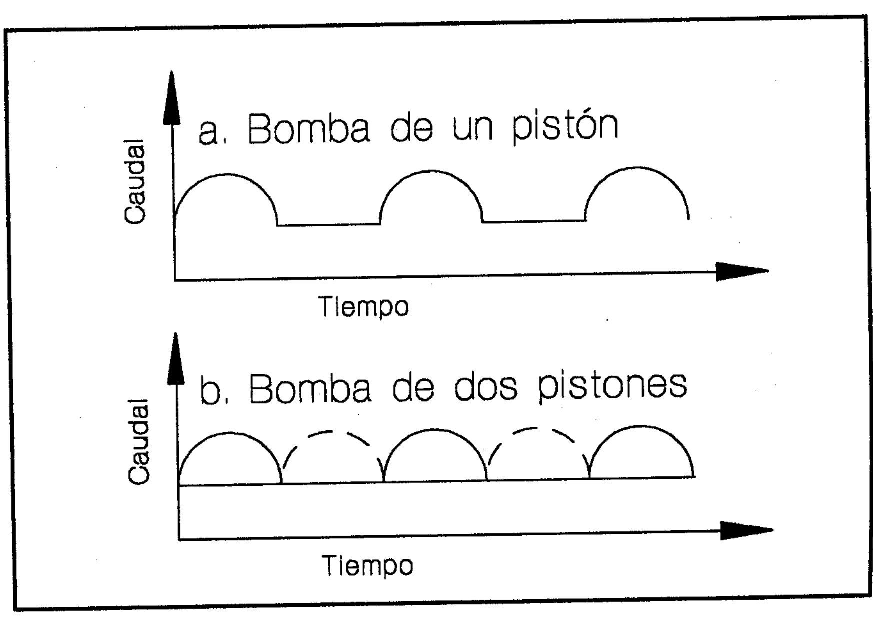


Fig. 2.6. Entrega de solvente de una bomba reciprocante, (a) de un solo pistón y (b) de dos pistones de funcionamiento paralelo y sincrónico.

que impulsa el solvente contenido en la cámara hacia la válvula de salida. Al reducirse la presión de la cámara por salida de la fase móvil, se reduce paralelamente la presión del aceite y se abre la válvula de entrada. En este punto, la bomba de baja presión llena nuevamente la cámara, iniciando otro ciclo.

Bomba Jeringa

La bomba jeringa es, a diferencia de las bombas reciprocantes, un dispositivo de desplazamiento continuo. Es decir, el solvente contenido en un cilindro es impulsado hacia el inyector por medio de un movimiento continuo y hacia adelante del pistón. El recorrido del pistón, y el volumen desplazado es, en los casos en que se aplica, suficiente para efectuar un número determinado de ensayos completos, sin necesidad de recargar su cámara (ver figura 2.7).

La principal ventaja de estas bombas es la total ausencia de pulsos ya que la cámara no necesita ser recargada, mientras que la principal desventaja está dada por el caudal y/o el tiempo necesario para recargar esa cámara cuando se vacía. Es evidente que este tipo de bomba no es compatible con los sistemas convencionales, con caudales de 1 o más ml/min, pero es el sistema ideal para las modalidad microbore y capilar, en las cuales el rango de trabajo se limita a pocos μl/min.

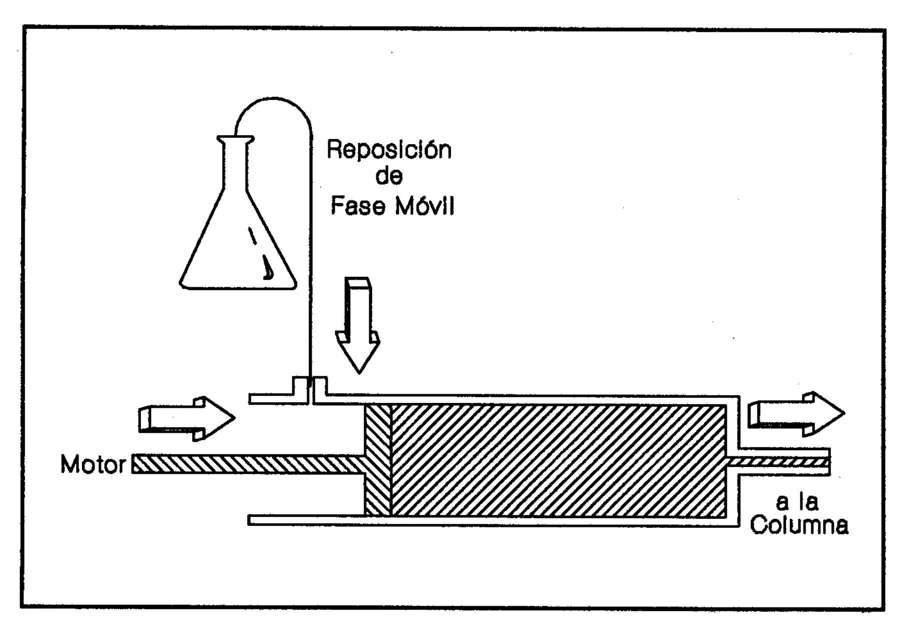


Fig. 2.7. Bomba Jeringa.

2.6 Sistemas de Gradientes

La HPLC isocrática es capaz de separar un número limitado de picos, típicamente 10 o 12. Para sistemas más complejos, o cuando la "polaridad" de los componentes a separar es muy diferente, es posible que la modalidad **isocrática** no sea capaz de resolverlos. En estos casos (ver figura 2.8), el analista puede optar por dos alternativas: la corrida multidimensional (column switching, ver sección 9.4) o la utilización de un gradiente de solventes.

El gradiente de solventes es comparable a la programación de temperaturas en cromatografía gaseosa. En GC se varía la temperatura en función del tiempo. En HPLC se varía la composición de la fase móvil (contenido porcentual del componente "fuerte de la mezcla), comenzando la elución con un solvente débil y aumentando progresivamente la proporción del componente "fuerte". Esta variación puede seguir un perfil lineal, cóncavo, convexo o una mezcla de estos perfiles en un mismo cromatograma. El gradiente de solventes se gradúa por el intervalo de variación, es decir, por la velocidad de cambio del solvente "débil" al "fuerte". Por ejemplo, puede iniciarse un gradiente en fase reversa comenzando con una fase móvil constituída por agua-metanol (90:10) y cambiando gradualmente hacia agua-metanol (10:90) con un perfil lineal (velocidad de cambio constante), completándose el proceso en 15 minutos. En todos los casos el gradiente debe

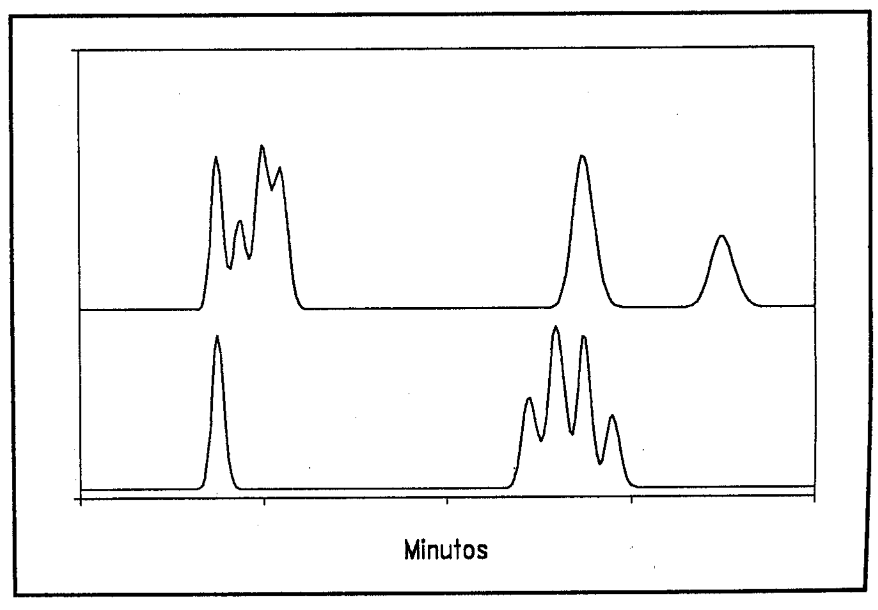


Fig. 2.8 Cromatogramas realizados en forma isocrática con picos no resueltos.

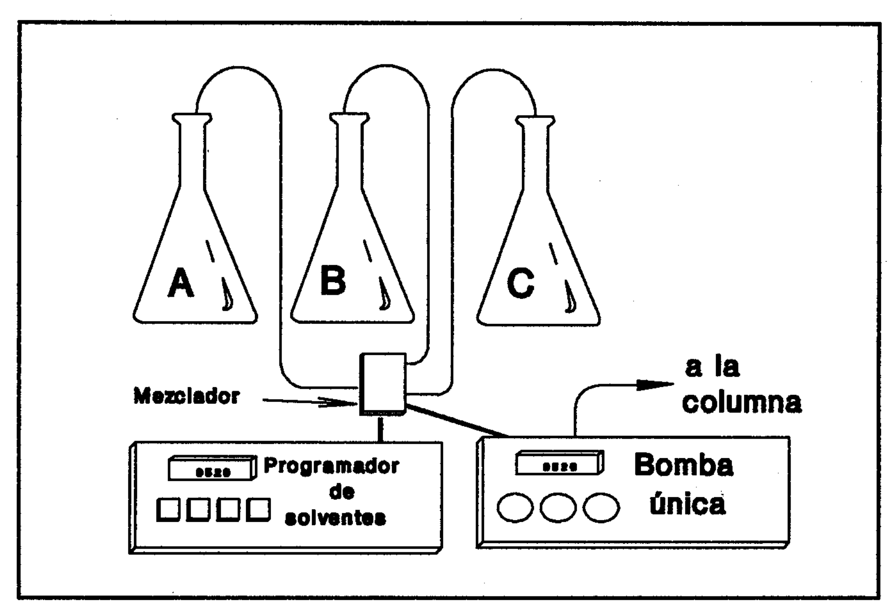


Fig. 2.9 Sistema de formación de gradiente de baja presión.

Fig. 2.10 Sistema de formación de gradiente de alta presión.

comenzar con el solvente débil, aumentando gradualmente la fuerza de la fase móvil que recibe la columna[3].
No debe confundirse la programación de solventes con la programación de caudales. La primera involucra un cambio efectivo de la fuerza de elución de la fase móvil durante la corrida cromatográfica, mientras que la segunda se refiere simplemente a la modificación del caudal de trabajo.
Existen básicamente dos tipos de formadores de gradientes: los de baja presión y los de alta presión. Los **gradientes de baja presión** emplean, en general, sólo una bomba y válvulas solenoides que entregan cada solvente en una cámara de mezclado de pequeño volumen (ver figura 2.9). La fase móvil "instantánea", es decir, la que se crea en ese preciso instante en base al programa deseado, es entregada a la bomba. Este sistema permite mezclar 2 a 4 solventes individuales, regulando el ciclo de apertura de cada válvula individual. La ventaja principal de los sistemas de baja presión está dada por el costo (ya que sólo es necesaria una bomba impulsora) y por la precisión lograda en los extremos del gradiente, ya que todo el caudal es entregado por el mismo dispositivo (ver más adelante, sistemas de alta presión). Este sistema requiere la desgasificación contínua para cada solvente individual. Esto se debe a que la solubilidad de los gases en los solventes individuales es en general diferente de su solubilidad en la mezcla deseada.
Los **gradientes de alta presión** utilizan una bomba de alta presión para cada solvente individual (figura 2.10). Cada bomba es comandada por un programador, y el solvente entregado se mezcla a alta presión en una cámara de bajo volumen y dirigido hacia el sistema. El principal inconveniente de este sistema reside en el costo, ya que cada solvente necesita su bomba impulsora. Por otra parte, las bombas deben ser exactas y precisas para que el gradiente mantenga su calidad en toda su extensión, en especial a bajos caudales. Por ejemplo, si se emplean dos bombas para crear un gradiente lineal con un caudal de 1.0 ml/min, en los extremos de 0 a 5 % del gradiente una bomba entregará 0 hasta 0.05 ml/min. La otra bomba entregará ese caudal cuando la primera entregue más del 95 % del programado.

2.7 Inyectores

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema. El inyector debe reunir una serie de características importantes, entre ellas:

- Debe ser fácil de operar.
- Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.

- No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.
- En casos especiales puede requerirse que opere a altas temperaturas, por ejemplo para mantener en solución polietilenos en SEC, o que sea biocompatible, para lo cual puede ser necesario que algunos de sus componentes sean de titanio o PTFE.

Ya han sido definitivamente descartados los inyectores de septum, similares a los empleados en GC. Sus inconvenientes eran, como puede esperarse, derivados del desprendimiento del material del septum que obstruían la columna y de la contrapresión que debía vencerse al inyectar la muestra, lo que obligaba con caudales altos a su interrupción momentánea.

Actualmente la totalidad de los inyectores de HPLC son válvulas que orientan el caudal hacia la columna, pasando o no según su posición, a través de un loop en el cual se introduce la solución a inyectar (ver figura 2.11). Las válvulas pueden accionarse manual o automáticamente.

Están constituidas por un cuerpo fijo, un rotor con un sello que gira y un loop de muestra externo que contiene la muestra. El loop es intercambiable, de modo que la cantidad de muestra inyectada puede escogerse entre una serie de medidas estándar (en los inyectores convencionales, entre 5 y 2000 μl).

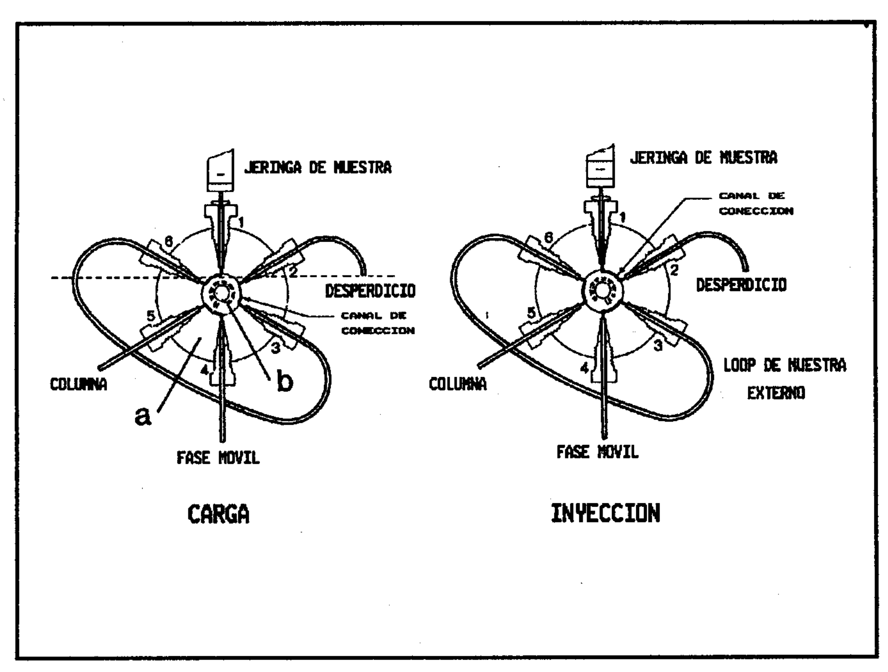


Fig. 2.11 Válvula de inyección de 6 vías y 2 posiciones.Gentileza de Valco Instruments Inc.

La figura 2.11 muestra las diferentes posiciones de una válvula de 6 vías. Para llenar el loop se gira el rotor hacia la posición de carga, obligando a la fase móvil a pasar directamente a la columna. En este paso, la vía de inyección queda abierta y a presión atmosférica. Se llena el loop en forma completa o parcial por medio de una jeringa y se vuelve a girar la válvula, obligando a la fase móvil a llegar a la columna a través del loop que contiene la solución muestra, a la que arrastra hacia la columna.
Cuando se utiliza el método de llenado total de loop, deben emplearse al menos 5 volúmenes nominales de loop[5] (por ejemplo, para un loop de 20 µl deben inyectarse 100 µl de solución), para evitar los errores debidos al flujo laminar. Del mismo modo, para el llenado parcial de loop debe emplearse un volumen no mayor del 50 % de su volumen nominal (ver sección 10.4). Este tipo de inyectores permite obtener precisiones[4] del orden de RSD = 0.05 % cuando se emplea el método del llenado total de loop, o de RSD = 0.3 % cuando se emplea el método de llenado parcial.

Inyectores Automáticos

Las válvulas de inyección de 6 vías, pueden accionarse eléctrica o neumáticamente y se utilizan en la construcción de inyectores automáticos. La precisión obtenida con estos inyectores es en general superior a la de métodos manuales, porque no dependen de la habilidad del operador. Los inyectores automáticos deben contener, además de la válvula de inyección y del mecanismo que permite su llenado, un dispositivo para colocar las muestras a inyectar, en general un carrusel que aloja viales donde se coloca las muestras. Las válvulas se accionan con motores eléctricos o por medios neumáticos ya sea empleando aire comprimido, nitrógeno o helio. Algunos equipos permiten controlar el avance y el retroceso del carrusel. De esta manera es posible que el vial conteniendo la solución estándar sea inyectada al principio del análisis e intercalarse tantas veces como sea necesario entre las soluciones muestra ya sea para control de la precisión o para recalibrar el instrumento.

Válvulas de Intercambio

Las válvulas de intercambio (ver sección 9.4) se emplean para agilizar o automatizar operaciones: preparación de las muestras, cambio de columnas, enriquecimiento de trazas, cromatografía de reciclo y operación de contracorriente. Es posible utilizar válvulas de 6 o más vías similares a las descritas para la inyección de las muestras u otras de diseño especial. Las diversas aplicaciones de la cromatografía de intercambio de columnas se discutirán en el capítulo 9.

2.8 Detectores

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite "ver" y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente[8] de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.
Los detectores deben reunir ciertas características ampliamente tratadas en la literatura[3,5], entre ellas:

- **Tener un amplio rango dinámico de respuesta.** El rango dinámico para un detector de LC está definido por la ASTM[6] como "el rango de concentraciones de una sustancia en análisis en la que un cambio en la concentración produce un cambio en la señal". Como puede deducirse, esto incluye tanto la respuesta lineal como no lineal. El valor mínimo de este rango se define como la "detectabilidad mínima"[6-10]. Si el rango dinámico es amplio, por ejemplo 10^5, esto nos indica que se podrá analizar un microcomponente en presencia de un macrocomponente sin mayores dificultades.
- **Poseer una respuesta lineal.** El detector debe medir alguna propiedad del analito que se incremente linealmente al aumentar su concentración. Se denomina **rango lineal** de un detector al rango de concentraciones que produce una respuesta lineal, este rango está incluido en el rango dinámico.
- **No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar.** El ensanchamiento de banda extracolumnar se refiere a la pérdida de eficiencia no adjudicable a la columna sino a la construcción del equipo cromatográfico (sección 3.4). En esta característica entran en juego tanto las dimensiones de la celda como la longitud y diámetro de la tubería de conexión. Para evitarlo, la celda del detector deberá tener un volumen tan pequeño como sea posible sin que ello perjudique la sensibilidad de la detección (en el caso del detector UV por disminución del camino óptico). Para las columnas analíticas el volumen de celda habitualmente está en el orden de los 3 a 12 µl.
- **Responder a todos los solutos.** La situación ideal es, obviamente, que el detector responda a todo tipo de solutos, pero esto no siempre es posible en HPLC debido a que para la detección deben obtenerse instrumentos capaces de medir una propiedad diferencial entre un líquido (la fase móvil) y un sólido (los analitos disueltos). Esta es, de hecho, una de las mayores diferencias que existe entre la GC y la HPLC, ya que en GC resulta muy sencillo diferenciar un gas de un sólido, y consecuentemente existen varios detectores que responden a muchos analitos.
- **Tener la sensibilidad apropiada.** Habitualmente esta propiedad se contrapone con la universalidad de detección. Es decir que detectores que responden a todos los analitos en general poseen sensibilidades menores, y en contrapartida, detectores que poseen una alta sensibilidad no responden a todos los solutos.
- **No afectarse por cambios de temperatura.** En lo posible los cambios de temperatura no deben modificar la señal emitida por los detectores. Esta característica no es

válida para el detector de índice de refracción en el cual, para trabajos que demanden una sensibilidad media o alta debe termostatizarse para tener una línea de base estable.

- **Poseer una buena relación señal/ruido.** El ruido de un detector es la máxima amplitud de la combinación de los términos de ruido largos y cortos en un período de tiempo dado, por ejemplo 15 minutos. Estas perturbaciones que se producen en la línea de base del detector se deben a la electrónica propia del instrumento, a problemas relacionados con las variaciones de temperatura, oscilaciones de la tensión de la línea eléctrica (lo cual en gran medida puede reducirse realizando una buena conexión a tierra de todo el instrumento), o a fluctuaciones en el caudal. El ruido puede clasificarse en:
  - ruido de término corto o de alta frecuencia: este tipo de ruido puede eliminarse por agregado de un filtro adecuado.
  - ruido de término largo o de baja frecuencia: este tipo de ruido suele confundirse con el pico de analito y no puede eliminarse con el uso de filtros.

  Adicionalmente puede aparecer otra variación en la respuesta de frecuencia aún menor. Esta variación se denomina deriva, y se observa en largos períodos de trabajo.

  El límite de detección de un analito determinado está en estrecha relación con el valor de ruido del instrumento. Cuanto mayor sea el ruido peor será el valor de límite de detección, este tema se tratará ampliamente en la sección 12.6.
- **No destruir la muestra.** Esta propiedad es una característica de casi todos los detectores de HPLC (una excepción es el electroquímico), y resulta muy importante cuando se desea recolectar al analito aislado, por ejemplo en cromatografía preparativa.
- **Tener una constante de tiempo baja.** La constante de tiempo de un detector indica la velocidad con que éste responde a un cambio instantáneo de la concentración del analito. Los valores habituales de la constante de tiempo de un detector cromatográfico son 0.5, 1.0 y 5.0[11] y pueden escogerse por medio de filtros de ruido electrónicos. Estos valores indican que a menor valor de constante de tiempo la filtración de los ruidos será menor, y la respuesta será más rápida, aunque pueden aparecer algunas señales no deseadas. Para ensayos de rutina puede emplearse una constante de tiempo de 1.0. Para ensayos rápidos (fast HPLC) una constante menor, y para cromatogramas muy ruidosos o con señales espurias puede intentarse un valor mayor.

Los detectores pueden clasificarse[3,5] en generales y selectivos. Los **detectores generales** miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Ejemplos típicos son el detector de índice de refracción y el de conductividad. Los **detectores selectivos** son aquellos sensibles a alguna propiedad propia del soluto, por ejemplo el detector UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada. Otro ejemplo es el

detector de fluorescencia, empleado para la detección de solutos con fluorescencia natural o conferida por reacción con un reactivo fluorogénico. Este último proceso se llama **derivatización** y será detallado más extensamente en la sección 9.5. Otro detector selectivo es el electroquímico, empleado para la detección de analitos que pueden oxidarse o reducirse ante la aplicación de un potencial.

Detectores Generales

Detector de Indice de Refracción

Este detector mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es un detector universal (ya que es altamente improbable que el índice de refracción del soluto sea similar al del solvente) y no destructivo. Como contrapartida es muy poco sensible, lo cual limita su campo de aplicación y es muy afectado por cambios de temperatura. No puede utilizarse con programación de solventes porque el cambio de la composición de la fase móvil se acompaña del cambio de su índice de refracción. Como consecuencia, no puede estabilizarse la línea de base. Existen tres tipos diferentes de detectores de Indice de Refracción: Fresnel, Deflexión, Interferométrico.

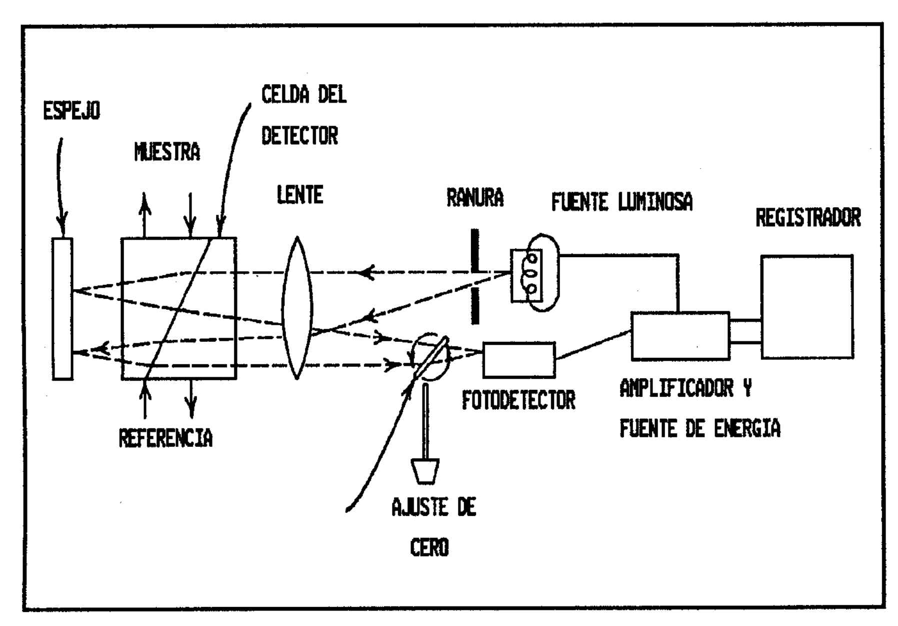


Fig. 2.12 Detector de indice de refracción de deflexión. Gentileza de Waters Chromatography Division.

- **Fresnel**

  Es un detector diferencial que utiliza dos celdas, una de medición que es atravesada por el eluído de la columna, y una celda de referencia por la cual fluye la fase móvil pura. Opera según la ley de Fresnel[3], que establece que "la cantidad de luz reflejada en una interfase líquido/vidrio varía con el ángulo de incidencia y con el índice de refracción del líquido". Posee una celda de medición pequeña, del orden de los 3 μl que está constituída por un prisma, una base de acero pulido y un sello de teflón entre ambos. Para cubrir todo el rango de Indice de refracción (η = 1.33 a 1.63) se utilizan dos prismas, el primero se utiliza con solventes de fase reversa y el segundo con solventes de fase normal. Para evitar el calentamiento de la celda por la radiación entre ésta y la lámpara se coloca un filtro infrarrojo.

- **Deflexión**

  Es un detector diferencial que, a diferencia del Fresnel, sólo usa un prisma para todo el rango de índices de refracción, pero empleando celdas de mayor tamaño, del orden de los 8 a 10 μl. La figura 2.12 muestra un diseño típico de estos detectores. Una celda contiene la fase móvil pura, y a través de otra celda fluye el eluído de la columna (muestra). Cuando se produce un cambio del índice de refracción en la celda de muestra, se produce un cambio en la trayectoria del haz luminoso que es registrado por el sistema óptico.

- **Interferométrico**

  La luz emitida por la fuente luminosa se polariza y divide en dos haces por un divisor de onda. Luego se focalizan ambas ondas y atraviesan la celda de referencia y la de medida. Finalmente se recombinan por una segunda lente y por un divisor de onda para llegar al fotomultiplicador. Cuando se produce una diferencia entre los índices de refracción de ambas celdas tiene lugar un cambio de fase entre ambas ondas y esto origina una diferencia en la intensidad de luz que llega al fotomultiplicador.

Detectores selectivos

Detector UV

Es el detector más empleado en HPLC. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes, con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. En general permiten cambiar el volumen de su celda, típicamente con volúmenes de 1 a 12 μl. Es un detector muy poco sensible a los cambios de caudal y de temperatura. El detector UV opera en el rango 190 a 350 nm, y en algunos equipos se puede extender a la zona del visible del espectro (350 a 700 nm) recibiendo así el nombre de detector UV/Visible. La concentración del analito en la muestra se determina por aplicación de la ley de Beer: A = a.b.C, donde A es la absorbancia, a es la

absortividad molar del analito, b es el camino óptico de la celda medido en cm y C es la concentración de analito en la muestra expresada en moles/l.
Existen dos tipos de detectores UV: los de longitud de onda fija y los de longitud de onda variable.

Detector de onda fija o fotométrico
Este detector opera a longitudes de onda prefijadas, determinadas por las líneas de emisión de su lámpara, habitualmente de mercurio de baja presión. Como longitudes de onda de trabajo se utilizan las bandas de emisión de la lámpara de mercurio, especialmente la fuerte línea de 254 nm. El verdadero monocromador del instrumento es la propia emisión de la lámpara pero, para eliminar líneas de otras longitudes de onda lejanas a la línea de trabajo se utilizan filtros de interferencia (ver figura 2.13). Además de la longitud de onda de 254 nm, suelen emplearse filtros que permiten trabajar a 313, 334, 365 nm. El empleo de filtros de óxidos de fósforo permite trabajar incluso a 280 nm. La lámpara de mercurio no emite a 280 nm, pero estos filtros, al ser irradiados con la lámpara de mercurio emiten a esa longitud de onda.
El cambio de lámpara permite incluso trabajar a otras longitudes de onda, por ejemplo a 214 nm con una lámpara de Zn, a 229 nm con una lámpara de Cd.

Detector de onda variable o espectrofotométrico
Este detector es simplemente un espectrofotómetro, en el cual se reemplaza el compartimiento de cubetas por una celda de flujo.
Es mucho más versátil que el detector de longitud de onda fija ya que al tener red de

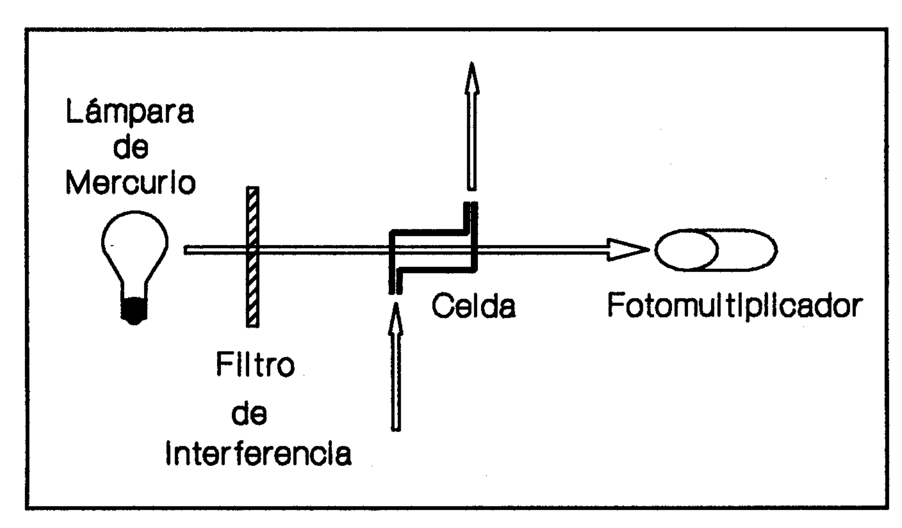


Fig.2.13 Detector de onda fija o fotométrico.

difracción permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo. Podremos escoger así la longitud de onda de máxima absorción del analito para aumentar la sensibilidad de medición. Emplea (ver figura 2.14) una lámpara de emisión contínua, de Deuterio o de Xenón. La luz emitida por la lámpara se enfoca en un monocromador, habitualmente una red holográfica de difracción, y la luz monocromática escogida se dirige hacia la celda de medida y de allí hacia el fotomultiplicador.

Uno de los últimos adelantos en los detectores UV es el denominado de **ordenamiento de fotodiodos** (ver figura 2.15). En los dispositivos "convencionales", la red de difracción se ubica antes de la celda, la que recibe luz monocromática seleccionada por la red. En los detectores de ordenamiento de fotodiodos se emplea un sistema óptico invertido: la celda se ilumina con luz "blanca", es decir, no monocromada y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocélula se emplea un conjunto de fotocélulas o fotodiodos montados en un chip de silicio. De esta forma, se consigue medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda, sino **todo el espectro de absorción del eluído** en tiempo real (ventaja multiplex).

Para poder controlar y procesar toda esta información es necesario la presencia de una computadora con el software adecuado. Los primeros equipos eran muy caros, pero la reducción de costos de la electrónica los ha colocado en valores razonables.

Es el detector ideal para realizar el desarrollo de los métodos analíticos por HPLC (ver capítulo 11), ya que permite asegurar, dentro de ciertos limites, la integridad de un pico cromatográfico.

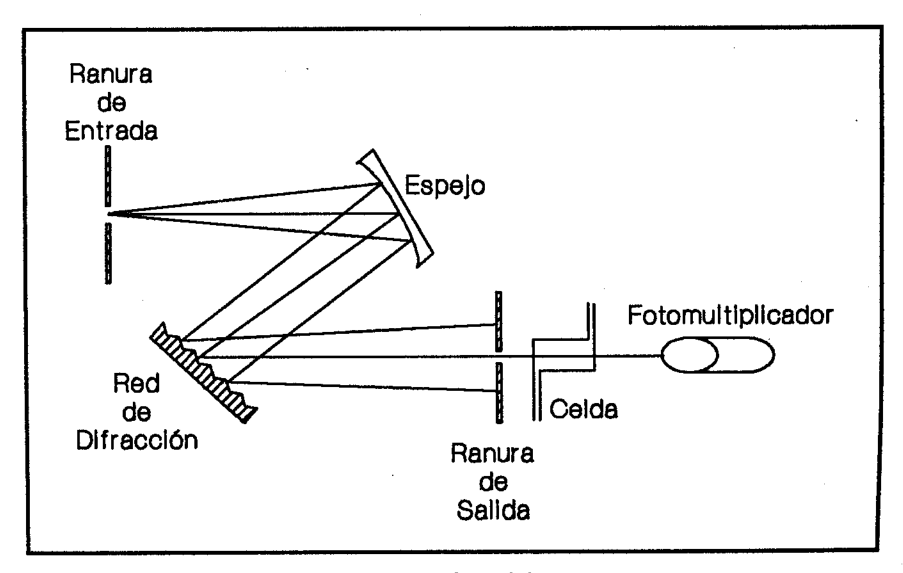


Fig.2.14 Detector de onda variable o espectrofotométrico.

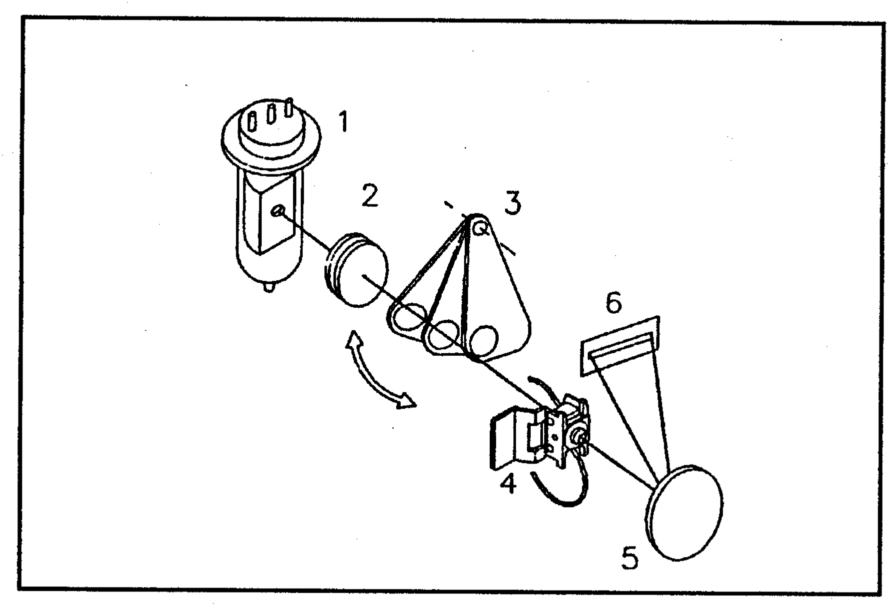


Fig.2.15 Detector de ordenamiento de fotodiodos, compuesto por: 1) lámpara de Deuterio, 2) sistema de lentes, 3) Chopper, 4) celda, 5) red de difracción y 6) ordenamiento de fotodiodos. Gentileza de Hewlett Packard.

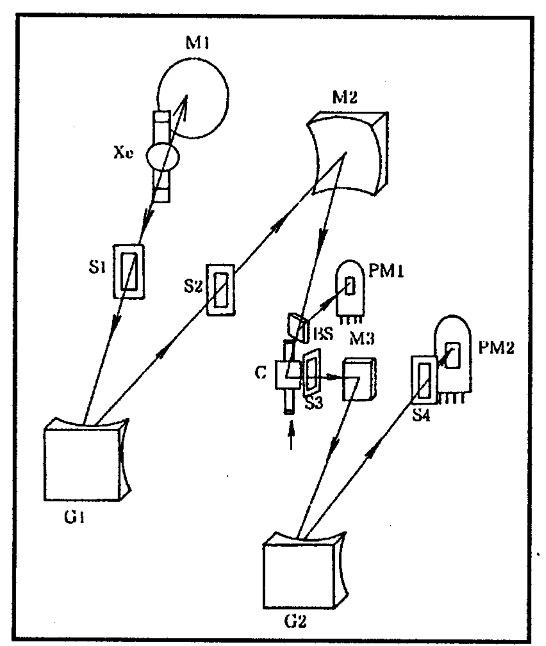


Fig. 2.16 Detector de Fluorescencia RF-535. Gentileza de Shimadzu Corporation International.

Detector de Fluorescencia

El detector de fluorescencia se utiliza para el análisis de sustancias que presentan fluorescencia "natural" o conferida por derivatización con un reactivo fluorogénico. Su alta sensibilidad y selectividad lo convierte en un detector adecuado para el análisis de trazas. La selectividad se debe a dos factores:

- existen pocas sustancias de fluorescencia nativa y las reacciones de derivatización implican la presencia de un grupo funcional derivatizable en la molécula de analito.
- se utilizan dos longitudes de onda, una de excitación y otra de emisión. Al excitar la muestra a una dada longitud de onda varios componentes de la muestra podrían absorber energía, pero pocos emitirán además a la longitud de onda elegida.

Ejemplos de este tipo de medición han sido ampliamente tratados en la literatura[12]. La figura 2.16 muestra un detector espectrofluorométrico típico. La luz emitida por la lámpara de Xenón se dirige al monocromador de excitación G1 por medio de un espejo cóncavo M1, a través de la ranura de entrada S1. El haz monocromado sale por la ranura S2, se focaliza en un espejo esférico M2 e incide en un separador de onda (BS). De aquí la casi totalidad del haz luminoso entra en la celda de medida y un 7 % incide en un fotomultiplicador PM1 para el control de la intensidad. La emisión del haz luminoso que sale de la celda pasa al monocromador de emisión, formado por la ranura de salida S3 y un espejo plano S3, una red de difracción cóncava G2 y una ranura de salida S4 siendo detectado por el fotomultiplicador PM2 que va a generar la señal de salida. La lámpara de Xenón es la fuente de emisión más ampliamente difundida[13] por producir un espectro continuo en el rango 260 a 660 nm y de muy alta intensidad.

Al igual que en el caso de los detectores UV, existen detectores de fluorescencia que permiten seleccionar las longitudes de onda (tanto de excitación como de emisión) por medio de filtros. La eliminación de dos redes de difracción repercute, como cabe esperar, tanto en el precio del dispositivo como en su versatilidad.

Los compuestos que no presentan fluorescencia nativa pueden derivatizarse con reactivos específicos (ver sección 9.4) para dar compuestos fluorescentes.

Detector Electroquímico

Es un detector muy sensible, unas 1000 veces más sensible que el detector UV, y altamente selectivo. La selectividad se debe, no sólo a que detecta compuestos capaces de ser oxidados y reducidos (ver tabla 2.II), sino que puede reducirse el número de esos compuestos detectados por una cuidadosa elección del potencial aplicado.

La detección de compuestos electrooxidables o electroreducibles ocurre en la superficie de un electrodo interpuesto en el paso del eluído de la columna. Este detector emplea tres electrodos: el electrodo de trabajo, el de referencia y el auxiliar (ver figura 2.17). La reacción redox es inducida en el electrodo de trabajo, mientras el electrodo auxiliar provee la carga de neutralización complementaria. Entre estos electrodos se fija el voltaje

apropiado para la detección. El electrodo de referencia, por su parte, produce un potencial fijo y estable contra el cual se mide el potencial del electrodo de trabajo, y un potenciostato provee una diferencia de potencial estable entre el electrodo de trabajo y el auxiliar, el que se monitorea por feedback desde el electrodo de referencia. Un amplificador de corriente de nanoamperes produce una señal de salida, proveniente del flujo de corriente entre los electrodos auxiliar y de referencia, causada por la transferencia de electrones del procesos de oxido-reducción.

Su principal limitación está dada por el tipo de fase móvil a emplear, que necesariamente debe ser conductiva, limitando su campo de aplicación a la cromatografía de fase reversa e intercambio iónico. Por otra parte, es evidente su naturaleza destructiva respecto del analito.

Para la construcción de electrodos se emplean entre otros elementos pasta de carbón, carbón cristalino, platino, oro y mercurio. El material más popular es el carbón. El electrodo de pasta de carbón tiene bajo costo y pequeña corriente de deriva pero no se puede emplear con fases móviles que contengan más de un 20 - 30 % de modificador orgánico. El electrodo de carbón cristal es compatible con los solventes orgánicos[14]. Como fases móviles se emplean buffers (ya que deben ser conductoras), en general de

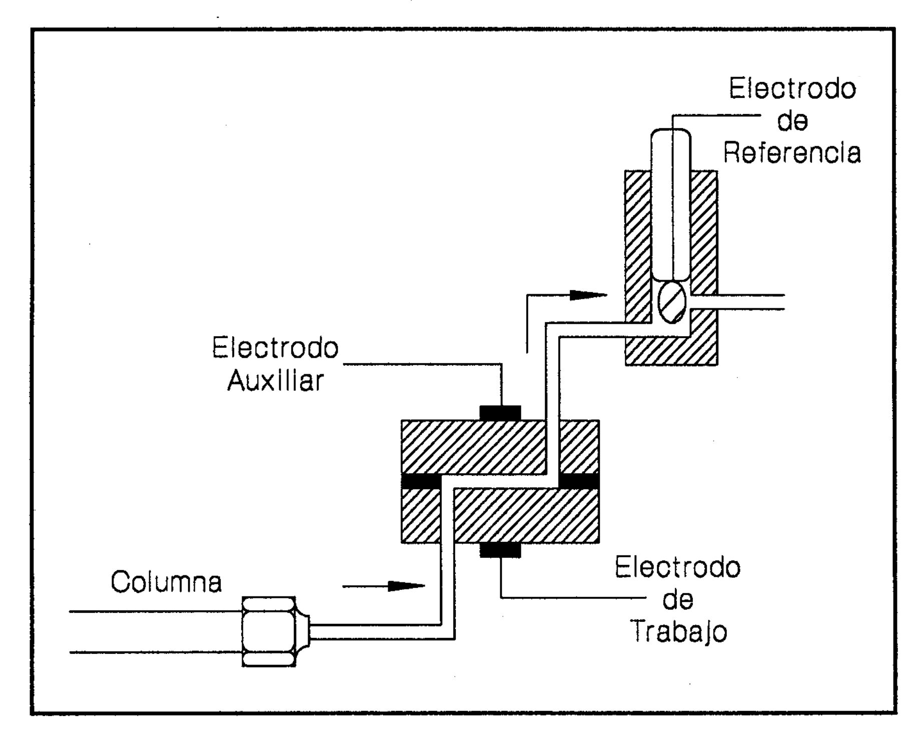


Fig. 2.17 Esquema de un electrodo de un detector electroquímico.

fosfatos, de concentración total no mayor de 0.02 M para permitir el empleo de modificadores orgánicos (metanol, acetonitrilo, THF). También pueden emplearse tricloroacetato, perclorato, etc.

La desgasificación es muy importante en el modo "reductivo", ya que la presencia de aire disuelto en la fase móvil da lugar al gasto de potencial en la reducción de ese oxígeno, generando señales ruidosas y baja sensibilidad de detección. En estos casos se recomienda la desgasificación contínua, en general por burbujeo de Helio. Esta precaución no reviste la misma importancia en la detección en modo "oxidativo", pudiendo emplearse los métodos convencionales de desgasificación.

Por otra parte, el hierro y sus óxidos presentes en la fase móvil en forma de iones, y provenientes de tuberías, válvulas, filtros metálicos, bombas, etc, son electroquímicamente activos, y pueden también producir corrientes de fondo y derivas de señal. En ocasiones resulta conveniente el agregado de EDTA 0.01 M a la fase móvil para complejar estos iones. Como precaución adicional es recomendable emplear componentes de titanio o bien pasivar periódicamente los componentes de acero por lavado del equipo (**sin columna**) con ácido nítrico 6 N, seguido por ácido acético 6 N y finalizando el tratamiento por lavado con abundante agua desionizada y filtrada.

DE REDUCCION	DE OXIDACION
Azocompuestos Peróxidos Nitrosaminas Tioamidas Nitrocompuestos aromáticos Nitrocompuestos alifáticos Organometálicos	Peróxidos Aminas aromáticas Purinas

Tabla 2.II Sustancias que se pueden analizar con detector electroquímico.

2.9 Sistema de toma y procesamiento de datos

El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por el otro, la de un gráfico o cromatograma, de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas (ver sección 10.6). Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal

proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, entre los que podemos citar:

- **Registrador gráfico**, que convierte la señal en un gráfico del tipo X-Y.
- **Integrador**, que permiten no sólo obtener un registro gráfico (cromatograma) sino también su tratamiento matemático para el cálculo de concentraciones.
- **Computadora**. Básicamente, el integrador es una computadora de uso muy específico. En este punto nos referimos a una computadora de tipo "personal", que permite con el software apropiado tanto el registro gráfico del cromatograma como los cálculos apropiados, la manipulación de datos, el almacenamiento de ensayos, generación de reportes, e incluso el manejo global de varios cromatógrafos. Como las computadoras necesitan señales digitalizadas, se necesita una interfase analógica-digital que convierta la señal analógica entregada por el detector.

Referencias

1. Dolan J.W., LC Liq Chromatogr HPLC Mag 3, 90-97, (1985)
2. Asshauer J. y Ullner H. "Practice of High Performance Liquid Chromatography" (Engelhardt Ed) Springer-Verlag (1986)
3. Snyder L.R., Kirkland J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2da edición, Wiley Int. Publication, 1979.
4. Technical Notes 1 Rheodyne Inc
5. Scott R.P.W. "Liquid Chromatography Detectors" , Journal of Chromatography Library, Vol 33, Elsevier Science Publishers 2da edición 1986
6. Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia 1988 Vol 14.01 páginas 149-58
7. Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia 1988 Vol 14.01 páginas 178-83
8. Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia 1988 Vol 14.01 páginas 235-45
9. Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia 1988 Vol 14.01 páginas 289-99
10. Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia 1988 Vol 14.01 páginas 344-48
11. Dolan J.W. y Berry V.V., LC Liq Chromatogra, 2 , 4, 290
12. Schulman S.G. "Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy - Physicochemical Principles and Practice", Pergamon Press, New York, 1977.
13. Lawrence J.F. y Frei R.W. "Chemical Derivatization in Liquid Chromatography", Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York, 1976.
14. Engelhardt H. "Practice of High Performance Liquid Chromatography", Springer - Verlag Berlin, 1986.

Capítulo 3

Bases de la Separación

3.1 Introducción

La cromatografía líquida es en esencia, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo. Así, el lugar donde se produce la separación, la columna, puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico, alrededor de la cual se monta un equipo de mayor o menor complejidad. En el caso más simple (ver figura 3.1), el cromatógrafo líquido estará constituido por:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: el detector.
- Un sistema de registro de los datos provenientes del detector.
  La señal del detector es siempre analógica y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por una computadora.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen dos productos:

- Un gráfico, el cromatograma, que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo (de elución).
- Un eluído o eluato, el fluido proveniente de la columna que, de recolectarse en forma secuencial o escalonada (manualmente o con un colector de fracciones), contiene la fase móvil e, idealmente, los componentes de la muestra separados.

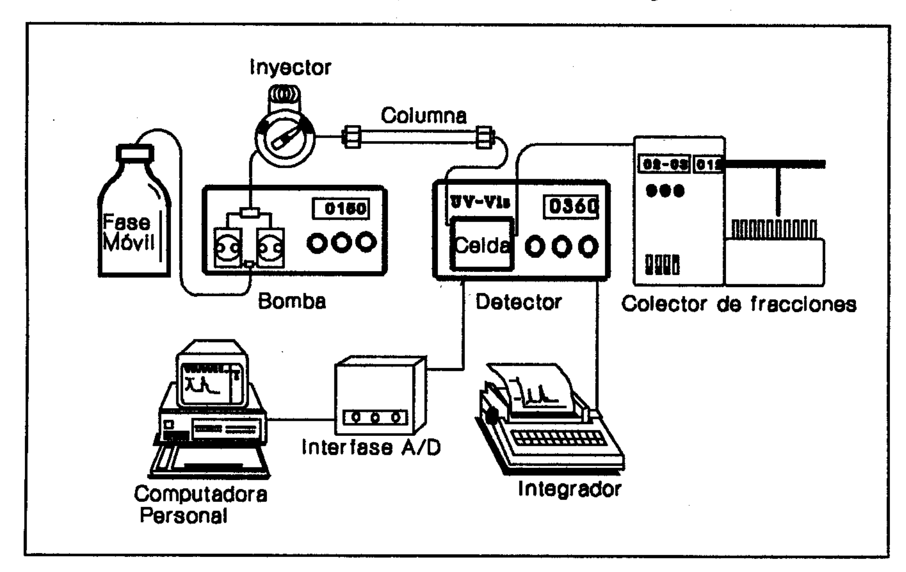


Fig. 3.1. Esquema de una posible configuración de un cromatógrafo líquido isocrático.

No se describirá aquí el mecanismo íntimo de la separación, de naturaleza variada según el modo cromatográfico, sino el proceso general, la contribución de cada componente del sistema al resultado final y el análisis del cromatograma, conceptos elementales para la comprensión de los restantes capítulos.

3.2 Bases de la Separación

Cuando la muestra y la fase móvil son forzados a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacción entre cada uno de estos componentes. Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas, son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria. Así, el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en eluir (es decir, en salir de la columna) y el más afín a la fase móvil se retiene menos y eluye antes. Para ilustrar el proceso, la figura 3.2 muestra algunas partículas de la fase estacionaria, moléculas de solvente (de la fase móvil) y moléculas de soluto (A,B y C), constituyentes de la muestra en ensayo.
Para cada caso, en la columna se establecerá un equilibrio que involucra la fracción de cada especie "disuelta" por cada fase en equilibrio. Por ejemplo, para A, B y C:

$A_m \rightleftarrows A_e$ $\qquad$ $B_m \rightleftarrows B_e$ $\qquad$ $C_m \rightleftarrows C_e$

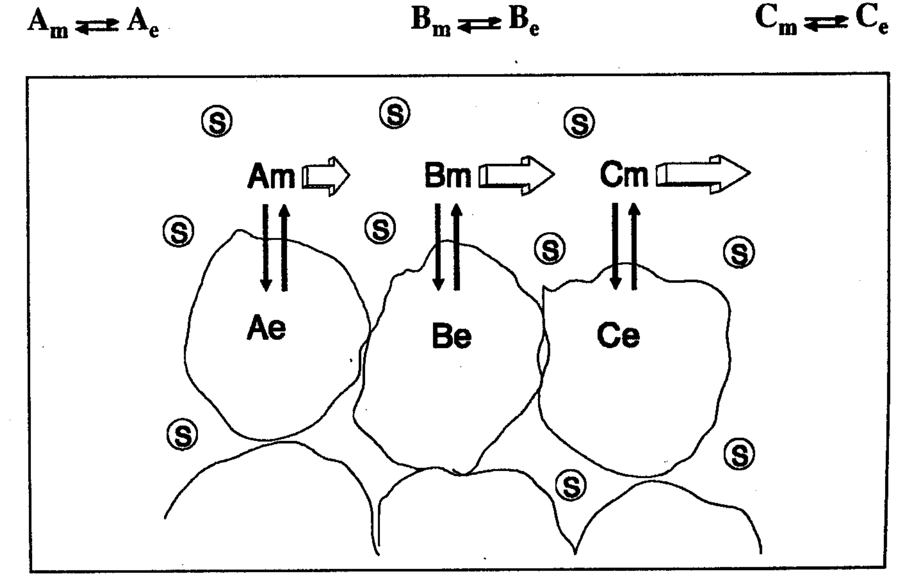


Fig. 3.2. Separación hipotética de los solutos A, B y C, en equilibrio entre la fase móvil (m) y la estacionaria (e). S representa las moléculas de fase móvil.

Representando con el subíndice "m" la fracción del soluto disuelta en la fase móvil y con el subíndice "e" la disuelta en la fase estacionaria. Dejando momentáneamente de lado la modalidad de exclusión por tamaño molecular, las características químicas de las especies A, B y C pueden ser, en relación a las moléculas de solvente y a los grupos funcionales de la fase estacionaria, lo suficientemente diferentes como para ser atraídas con distinta fuerza por ésta última. Como resultado, en este ejemplo hipotético, las moléculas de C viajarán a mayor velocidad que las de B y éstas a mayor velocidad que las de A. Para que A eluya de la columna, será necesario que un determinado volumen de fase móvil (eluyente), llamado volumen de elución, atraviese la columna. El volumen de elución será entonces diferente y creciente para C, B y A. Por otra parte, si se trabaja a volumen constante (la modalidad habitual en HPLC), el volumen de elución de cada especie será proporcional a un tiempo conocido como tiempo de retención o de elución.

3.3 Nomenclatura y Cálculos

La cromatografía, como cada rama de la ciencia química, tiene un lenguaje particular. Evidentemente, como cada laboratorio no constituye una isla independiente y sus ensayos son compartidos, publicados o discutidos en los medios que correspondan, se hace necesario unificar ese lenguaje y estandarizar los términos empleados. Así, la nomenclatura en cromatografía fue estandarizada por la American Society for Testing and Materials, ASTM[1] y la International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC[2] y es, naturalmente, materia de constante debate y actualización[3,4].
No se pretende aquí enumerar la totalidad de los términos cromatográficos, ni discutir exhaustivamente su definición. Sin embargo, para la mejor comprensión de este libro es necesario definir algunos conceptos, entre los cuales debemos incluir los siguientes:

- **Cromatograma:** el término cromatograma fue acuñado por Tsweet a comienzos de siglo. En sus trabajos, lograba la separación de los componentes de una mezcla de pigmentos vegetales en solución por percolación de un solvente, la fase móvil, a través de una columna rellena con un material finamente subdividido, la fase estacionaria. Como el caudal se discontinuaba antes de que el primer componente emergiera de la columna, el resultado, al que por sus características cromáticas Tsweet llamó cromatograma, consistía en una serie de bandas coloreadas separadas a lo largo de la columna, según su mayor o menor grado de adsorción al relleno. En la década del '30 el método fue modificado permitiendo que los componentes salieran de la columna para recogerse en fracciones que posteriormente se evaluaban. En la década del '40, Tiselius incorporó un monitor de medición continua (índice de refracción). A pesar de no mantener el significado original, el resultado siguió denominándose cromatograma, por extensión del término de Tsweet. El concepto actual corresponde,

según IUPAC[2], a "un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del efluente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del efluente, versus el volumen de efluente o tiempo". Así, un cromatograma corresponde, por ejemplo, a la curva representada en la figuras 3.3 a y b. Las abcisas corresponden al tiempo durante el cual se efectúa la medición. Si el caudal es constante, la proporcionalidad entre tiempo y volumen de elución es directa. Las ordenadas corresponden a la señal analógica proveniente del detector y su significado dependerá del tipo de medición efectuada (absorción, índice de refracción, fluorescencia, etc). La altura de la señal indica en cada momento la intensidad de la respuesta, en general proporcional a la concentración del soluto, la cual se evalúa por medición manual o electrónica (área bajo la curva o altura de pico). Idealmente, el pico tiene distribución normal (gaussiana), aunque algunos fenómenos pueden provocar el alejamiento de esta condición y no es infrecuente encontrar asimetrías de mayor o menor intensidad (figuras 3.2. c y d). Este alejamiento de la condición ideal es muchas veces inevitable, aunque se trata de minimizarlo ajustando las condiciones operativas ya que, como puede suponerse, la deformación del pico dificulta tanto la evaluación cuantitativa como la confiabilidad cualitativa. Otros tipos de inconvenientes en la interpretación del cromatograma pueden originarse en un método separativo ineficiente, separaciones pobres con superposición total o parcial de picos, en la calidad de la señal (ruidos, derivas, etc), en factores de diseño instrumental, errores operativos, etc.

El cromatograma comienza en el momento en que la solución en ensayo es inyectada. A partir de ese punto, las señales encontradas en el cromatograma pueden clasificarse como:

- **Volumen de elución** (V_e): es el volumen de fase móvil eluida entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto. A caudal constante, el tiempo transcurrido entre dichos puntos corresponde al tiempo de elución o tiempo de retención.

- **Volumen muerto** (V_0): es el volumen total de solvente entre el punto de inyección y el de detección, exceptuando el correspondiente a las partículas de fase estacionaria. Comprende al volumen que la fase móvil puede ocupar entre las partículas, entre las partículas y la pared de la columna, en el interior de las tuberías, uniones, fritados, etc. Evidentemente la solución atraviesa "limpiamente" estos espacios, sin participar en ningún proceso separativo. En el caso de que la solución inyectada contenga algún soluto que no se retenga en la fase estacionaria, su elución no será instantánea sino que corresponderá a un volumen de elución igual al volumen muerto. Este volumen corresponde, de trabajar a caudal constante, a un tiempo conocido como tiempo muerto (t_0) y se visualiza (no siempre) en el cromatograma como el primer pico o disturbio de la línea de base. Sin embargo, como su valor se emplea frecuentemente en algunos cálculos cromatográficos, no debe tomarse este valor de los cromatogramas de cualquier ensayo, ya que no se tiene la completa seguridad de que el primer

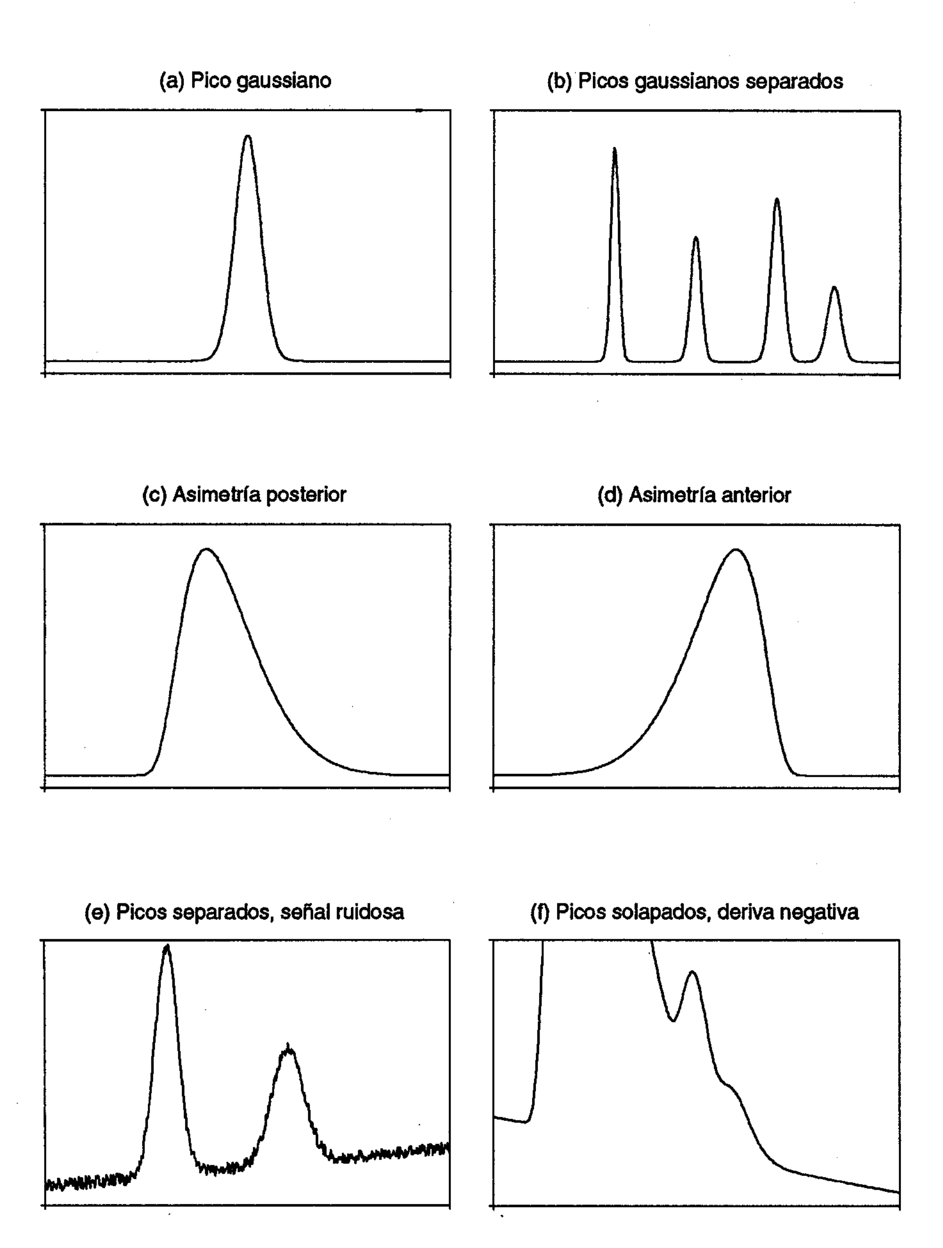


Fig. 3.3. Algunos tipos de picos cromatográficos, entre los cuales algunos resultan de fácil evaluación (a y b) y otros, más complejos (c a f).

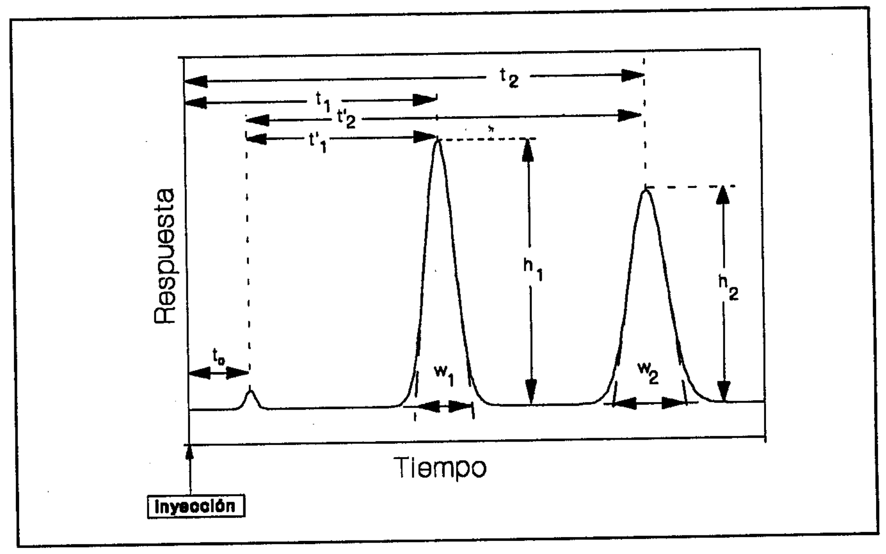


Fig. 3.4. Cromatograma tipo y algunos parámetros de medición frecuente. Para simplificar solo se representa el tiempo en abcisas, aunque a caudal constante el tiempo será proporcional al volumen de elución.

pico, generalmente debido al solvente de disolución de la muestra o a alguna impureza desconocida, no se retenga en absoluto en el material de la fase estacionaria. En RPLC, por ejemplo, pueden emplearse soluciones diluidas de nitrato de sodio o de dicromato de potasio, aunque existen aún controversias por el significado del valor obtenido y por su dependencia respecto de la fase móvil empleada[5,6].

La comprensión de este parámetro nos permite llegar a una importante conclusión: no debe evaluarse ningún soluto cuyo tiempo de retención corresponda al volumen muerto. Es claro que en esas condiciones, el soluto no ha tenido oportunidad de separarse de ninguno de sus eventuales acompañantes en la solución. Por el contrario, su señal puede resultar modificada por la coelución de solvente de disolución o de impurezas agregadas.

Respecto del significado del término "volumen muerto" (dead volume), Ettre[3] indica que en realidad corresponde a un espacio extracolumnar y propone modificar su denominación, ya que es accesible tanto a la fase móvil como al soluto, es responsable de ensanchamiento de banda y perturbaciones del caudal y en realidad, no puede considerarse como "muerto". Términos más aceptables pueden ser volumen vacante (void volume) o extracolumnar.

- **Línea de base:** es la porción del cromatograma donde sólo se aprecia la elución de la fase móvil, sin señal debida al soluto.

- **Tiempo de retención** (t_n): es el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto enésimo (máxima señal). La distancia entre este máximo de la señal y la línea de base es la altura del pico (h_n) en cuestión.

- **Tiempo de retención neto o relativo** (t'_n): dado que el volumen extracolumnar depende de varios factores ajenos a la separación misma, es frecuente expresar el tiempo de retención neto de un pico determinado como diferencia entre su tiempo de retención y el tiempo muerto en lugar del tiempo de retención absoluto. Así, para el pico enésimo:

$$t'_n = t_n - t_o \qquad (3\text{-}1)$$

En ambos casos, el producto del tiempo de retención (absoluto o neto) y el caudal (F) darán el volumen de retención (absoluto o relativo):

$$V_n = t_n\,(\text{min})\;\; F\,(\text{ml}\,.\,\text{min}^{-1}) \qquad (3\text{-}2)$$

- **Velocidad lineal** (u): como la velocidad a la cual la fase móvil se desplaza a través de la columna no es sólo función del caudal sino también de la sección interna de la misma, la comparación de métodos que emplean columnas de diferente diámetro interno hace preferible la expresión de la velocidad lineal en lugar del caudal. Si "L" es la longitud de la columna expresada en cm y t_o el tiempo muerto medido en segundos, la velocidad lineal en cm/segundos puede calcularse como:

$$u = \frac{L}{t_o} \qquad (3\text{-}3)$$

- **Factor de capacidad** (k'): es el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles de soluto en la fase móvil y está relacionado con el coeficiente de distribución entre ambas fases.

$$k' = \frac{\text{Número de moles de soluto en la fase estacionaria}}{\text{Número de moles de soluto en la fase móvil}} \qquad (3\text{-}4)$$

Puede demostrarse[7] que k' es proporcional al tiempo de retención del soluto y se calcula para el pico enésimo como:

$$k' = \frac{(t_n - t_o)}{t_o} \qquad (3\text{-}5)$$

$$k' = \frac{(V_n - V_o)}{V_o} \qquad (3\text{-}6)$$

Evidentemente, surge de las ecuaciones (3-5 y 6) que k' puede variar entre cero e infinito. Si el soluto no se retiene, su tiempo de elución será igual a t_o (o bien su volumen de elución igual a V_o) y si se retiene en forma irreversible, su tiempo (y su

volumen) de elución será infinito.

El valor de k' puede ajustarse modificando la fuerza de elución de la fase móvil, por ejemplo:

- **en fase reversa,** k' disminuye al aumentar la proporción del componente orgánico (MeOH, AcN, THF) y aumenta al aumentar la proporción de agua.
- **en fase normal,** k' disminuye al aumentar la proporción de solvente polar y aumenta al aumentar la proporción del no polar.
- **en cromatografía de intercambio iónico,** k' disminuye al aumentar la concentración del contraión (buffer o sal agregada), o la proporción de solvente orgánico. La variación del pH de la fase móvil puede aumentar o disminuir k' de acuerdo a las características ácido-base del analito.

La medición de k' es una operación muy frecuente, ya que su valor se emplea tanto para evaluar la retención como para ajustar la separación (ver capítulo 11). Así, el valor de k' se regula entre 2 y 10 para mezclas de pocos componentes, o entre 0.5 y 20 si fuera necesario "hacer lugar" en el cromatograma para alojar un gran número de picos.

- **Factor de separación** (α): es el cociente entre los factores de capacidad (k') de un par de picos. Si no existe separación, α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación . El α de los picos "1" y "2" se calcula como:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \qquad \text{(3-7)}$$

A diferencia de k', α no depende de la fuerza de elución, sino de la afinidad del soluto respecto de la fase móvil y de la columna. Así, una disminución de la fuerza de la fase móvil produce un aumento de la retención, que en general no se acompaña de cambios de selectividad. Es decir, el aumento será proporcional para todos los solutos y el cociente entre ellos se mantendrá aproximadamente constante. La variación de α puede lograrse de varios modos, pero lo que se intenta es, en definitiva, variar el tipo de interacción entre las variables del sistema, es decir, soluto-fase móvil-fase estacionaria. Las variaciones usuales son:

- Modificación del componente "activo" de la fase móvil (en fase reversa, MeOH por AcN o THF; en fase normal, cloroformo por cloruro de metileno o metil terc butil éter).
- Modificación del pH de la fase móvil.
- Empleo de aditivos (reactivos de apareamiento, complejantes, etc).
- Cambio de la fase estacionaria.

- **Resolución** (R). Como se ha dicho, el objetivo primario de la cromatografía es la separación de los constituyentes de una muestra. Es natural, entonces, la necesidad de contar con una expresión cuantitativa de la calidad de la separación. Esta expresión,

la resolución, se calcula por cada par de picos adyacentes como:

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{½\ (w_2 + w_1)} \qquad \textbf{(3-8)}$$

Donde t_2 y t_1 corresponden a los tiempos de retención de los picos 2 y 1, w_2 y w_1 a los anchos de pico medidos en su base, como se indica más adelante.

- **Ancho de pico** (w). Esta medición se puede efectuar con varios objetivos: para calcular la eficiencia de la columna (platos teóricos), la resolución, para el cálculo manual del área de picos y en algunos integradores electrónicos se ingresa como dato de ajuste de integración.

  El ancho de pico puede tomarse en varias posiciones (a varias alturas) y si la señal fuera perfectamente gaussiana (ver figura 3.5), las apreciaciones que resultan de esta medición serían equivalentes. Sin embargo, como esta condición raramente se cumple, debe indicarse cual es el método empleado. En general el ancho de pico suele tomarse:

  - ❑ Al 60.7 % de la altura del pico (w_i). En este lugar se encuentran los puntos de inflexión y en una distribución normal, la sección horizontal de la curva corresponde a dos desviaciones estándar (2 σ).
  - ❑ Al 50 % de la altura del pico (w_h, ancho de pico a media onda).
  - ❑ En la base del pico (w_{tan}). Este valor se obtiene prolongando la línea de base por debajo del pico y midiendo el segmento de esta línea, delimitado por la extrapolación de las ramas ascendente y descendente del pico.
  - ❑ Para obtener un mayor reflejo de la asimetría sobre la medición, no es infrecuente encontrar medidas tomadas en otros sectores del pico (ver figura 3.6).

- **Platos Teóricos.** El concepto de plato teórico fue desarrollado en 1941 por Martin y Synge para la cromatografía de partición líquido-líquido (LLC). Para explicar el fenómeno separativo, compararon la LLC con un proceso de distribución en contracorriente, donde la extracción en las dos fases se repite varias veces en forma encadenada. La diferencia fundamental residía en que en la cromatografía, el proceso es continuo. Sin embargo, la columna podía dividirse en cortes o rodajas imaginarias donde se conseguía un equilibrio transitorio, antes de que la fase móvil avance hacia el siguiente. Cada corte se llamó "plato" y su espesor "altura equivalente del plato teórico" (H o HEPT). Entonces, para una columna de longitud L, con N platos teóricos, la altura del plato resulta:

$$H = \frac{L}{N} \qquad \textbf{(3-9)}$$

La eficiencia de una columna cromatográfica y por lo tanto su "poder" separativo se mide en función de su número de platos teóricos. Para lograr la separación de dos componentes dados, no sólo deben eluir a distintos tiempos de retención, sinó que el ancho de los picos debe ser tan bajo como sea posible. El número de platos teóricos,

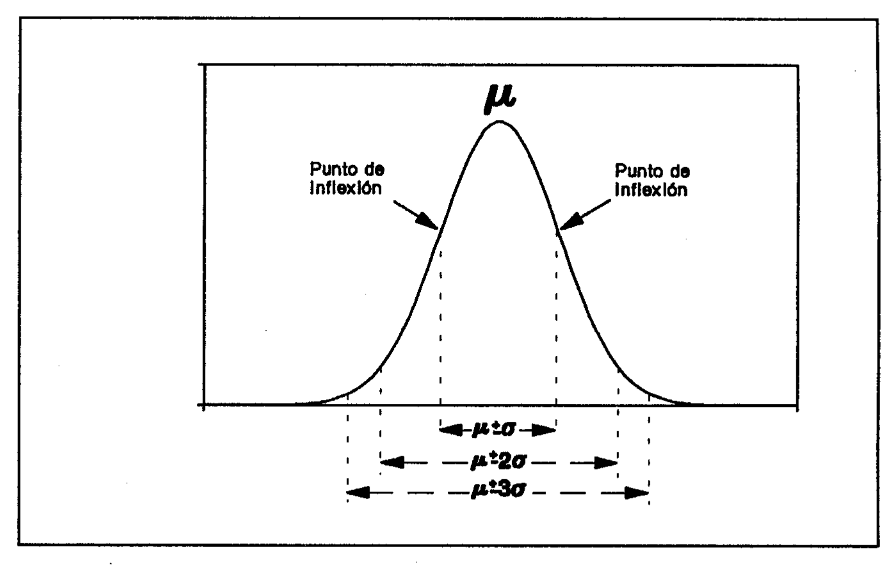


Fig. 3.5. Curva de Gauss. El área definida por $\mu \pm \sigma$ corresponde al 68 % del total, el de $\mu \pm 2\sigma$ al 95% y el de $\mu \pm 3\sigma$, al 99.7% del área total bajo la curva.

puede calcularse en función del ancho del pico como:

$$N = 16 \left(\frac{t_n}{w_{tan}} \right)^2 \tag{3-10}$$

Donde t_n es el tiempo de retención del pico enésimo y w_{tan} su ancho, medido sobre la línea de base y expresado en unidades de tiempo (el cálculo puede también expresarse en función del volumen de retención y el ancho del pico, en unidades de volumen).

H (y consecuentemente N) depende no sólo el diámetro, morfología y calidad de la partícula sino también de la calidad del empaquetamiento, de su envejecimiento y eventuales vaciamientos o canales producidos por disolución o golpes. Por otra parte, no sólo la columna determina el valor de N. Como se verá más adelante, muchos factores instrumentales contribuyen al ensanchamiento de los picos (longitud y diámetro de tuberías, volumen y geometría de la celda del detector, etc). Otros factores determinantes de N y ajenos a la columna "física" corresponden a los procesos por los cuales la geometría del pico se aleja del ideal, es decir, de la curva normal o gaussiana (ver figuras 3.3.a, c y d).

Lamentablemente no existe un criterio unificado para la medición de la eficiencia. Es decir, no existe una forma operativa, especificaciones instrumentales, solutos de referencia, ni tampoco forma de expresar el resultado (platos/m, platos/columna, etc).

Por esta razón, no puede compararse directamente la eficiencia reportada por distintos fabricantes de columnas para sus productos. Por otra parte, si se efectúan mediciones en un cromatograma que contiene más de un pico, puede observarse alguna ligera variación en el número de platos teóricos calculado para cada soluto. Esto no significa que la determinación de N no tenga importancia. Por el contrario, la eficiencia suele medirse en varias ocasiones, por ejemplo:

- Para comparar materiales (en particular columnas) y métodos, bajo las mismas condiciones experimentales.
- Para optimizar un método analítico.
- Para controlar que un método continúe siendo idóneo.
- Para controlar el estado de una columna a lo largo de su vida útil.

Bidlingmeyer y Warren[8] analizaron las modalidades empleadas para la determinación de N, concluyendo que tanto el cálculo basado en la medida del ancho de pico en la base, como la tomada a media altura de pico son poco exactas cuando el gráfico se aleja de la normalidad (ver figura 3.6 y tabla 3.I). Sin embargo, como estos autores reconocen, el método debe elegirse de acuerdo a las necesidades del analista, teniendo en cuenta, naturalmente, las limitaciones de cada modalidad.

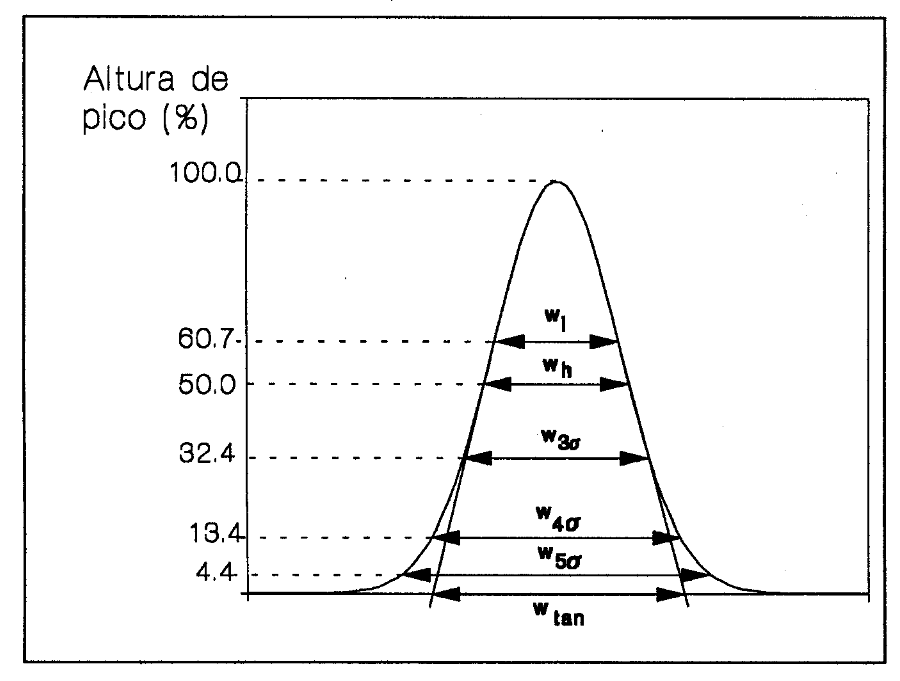


Fig. 3.6. Anchos de pico empleados para el cálculo de N (adaptado de referencia 8, con autorización del editor).

$$N = a \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 \qquad (3\text{-}11)$$

Tabla 3.I. Métodos para el cálculo de N. El factor "a" corresponde a la ecuación 3-11 (de referencia 8, reproducido con autorización del editor).

w	a	método	exactitud
w_i	4	inflexión	baja
w_h	5.54	media onda	baja
w_3	9	3 σ	-
w_4	16	4 σ	media
w_5	25	5 σ	alta
w_{tan}	16	tangente	baja

- **Asimetría** (As). La asimetría (tailing) es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva gaussiana (ver figuras 3.3 c y d) y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación, e incluso a oscurecer picos adyacentes. Si bien no existe un criterio único para el cálculo de asimetría, las fórmulas empleadas con mayor frecuencia son:

$$As_{10\%} = \frac{b}{a} \qquad (3\text{-}12) \qquad\qquad As_{5\%} = \frac{b'}{a'} \qquad (3\text{-}13)$$

donde a y b son las medidas entre la línea que une el máximo del pico con la línea de base y los extremos anterior y posterior del pico, tomados al 10 % de su altura. Por su parte, a' y b' son los mismos parámetros al 5 % de dicha altura (ver figura 3.7). Los motivos que generan picos asimétricos, su consecuencia y formas de reducir este efecto serán tratados en los capítulos 11 y 13.

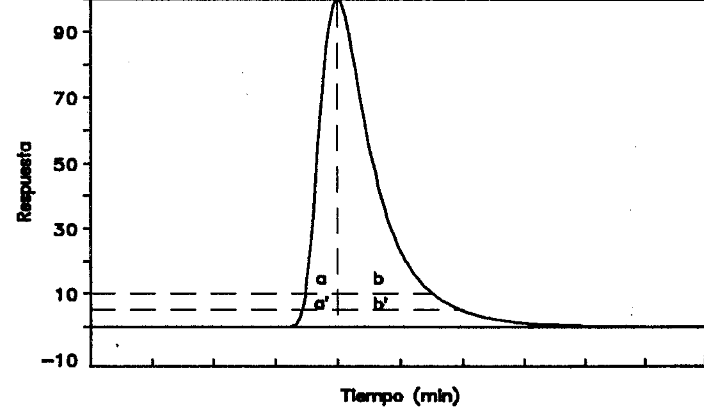


Fig. 3.7. Representación de un pico asimétrico y las zonas de medición de asimetría

3.4 Procesos de Ensanchamiento de Banda

Cuando se inyecta una mezcla de solutos al sistema cromatográfico, por ejemplo 20 µl de solución, la mezcla se separa y puede eventualmente recolectarse en forma fraccionada, de modo de obtener los compuestos puros. Si en lugar de tiempos tomados frecuentemente por comodidad consideramos la retención en función del volumen de elución, para recolectar un pico debe fraccionarse el total del volumen entre el comienzo y la finalización de su señal. Ya sea que las fracciones se recolecten o no, al salir de la columna cada componente estará diluido, no en los 20 µl originales de solvente sino en un volumen mayor, debido a que sufre diluciones a medida que avanza a través del sistema cromatográfico. Este fenómeno puede verse en los cromatogramas, donde se ve claramente que los picos (o bandas) menos retenidos tienen menor ancho que los más retenidos. La ecuación (3-10) puede reordenarse con cálculos algebraicos muy simples para obtener la (3-14) y considerando que el número de platos teóricos es aproximadamente constante para todos los solutos, se deduce que a mayor tiempo de retención, corresponderá mayor ancho de pico.

$$w = t_r \frac{\sqrt{N}}{4} \qquad \textbf{(3-14)}$$

Este ensanchamiento de banda es normal y como depende de la eficiencia (N) de la columna, los procesos que la gobiernan se conocen como procesos de ensanchamiento de banda intracolumnares. Existen sin embargo otros procesos que provocan el ensanchamiento de los picos y son producidos por factores instrumentales y experimentales. Estos se conocen como procesos de ensanchamiento de banda extracolumnares y si bien son inevitables, su conocimiento permite controlarlos y eventualmente minimizarlos.

Ensanchamiento de banda intracolumnar

La eficiencia de una columna se mide, como se ha visto, por su número de platos teóricos (N), o bien, para independizarnos de las características físicas del tubo que constituye la columna, por la altura equivalente a un plato teórico (HEPT o simplemente H).
La primer ecuación de HEPT, fue postulada por Van Deemter[9] en 1956 para describir el ensanchamiento de banda en GC. Estos principios fueron luego aplicados a LC, aunque inicialmente con poca concordancia experimental, lo que dio origen a las críticas y teorías alternativas que cabía esperar. Sin embargo, en 1983 Katz[10] reafirmó la teoría inicial con una serie de experimentos cuidadosamente controlados.
Según Van Deemter, las contribuciones al ensanchamiento de banda dentro de una

columna cromatográfica son cuatro, a saber:

- ❑ Proceso multipaso (o de caminos múltiples)
- ❑ Difusión longitudinal
- ❑ Resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil
- ❑ Resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria

Proceso Multipaso

En una columna rellena con partículas de la fase estacionaria, el soluto encontrará diversos caminos, los cuales será impulsado a recorrer por la fase móvil. Evidentemente, en un trayecto finito, algunas moléculas seguirán caminos directos y otras, encontrando partículas en su paso, serán obligadas a seguir caminos más tortuosos, retrasándose respecto de las primeras. Este fenómeno se conocido también como Difusión de Eddy y su contribución al ensanchamiento de banda está dado por el diámetro de la partícula (dp) y por una constante que depende del relleno y de la calidad de su empaquetamiento en la columna (γ), es decir:

$$H_l = d_p \ \gamma \qquad (3\text{-}15)$$

Donde Hi es la contribución del proceso multipaso a la altura equivalente a un plato teórico. En la ecuación simplificada de Van Deemter, esta contribución se simboliza como "A".

Difusión Longitudinal

Si un soluto se abandona en un líquido (la fase móvil) estanco, sus moléculas no permanecerán inmóviles sino que difundirán en todas direcciones hasta que su concentración sea uniforme en todo el seno del líquido. Este efecto nunca se observa plenamente en LC, pero es claro que siempre ocurre, en forma evidente o imperceptible y que será más notorio cuanto menor sea el caudal empleado.

La contribución de este efecto al ensanchamiento es, como puede esperarse, una función inversa de la velocidad lineal de la fase móvil (u) y directa respecto del coeficiente de difusión del soluto en el solvente (D_m) y de alguna constante que evalúe el espacio ocupado por la fase móvil y su geometría (λ).

La contribución de la difusión longitudinal al ensanchamiento de banda (H_l) será:

$$H_l = \lambda \ D_m \ \frac{1}{u} \qquad (3\text{-}16)$$

Expresando la ecuación sólo en términos de velocidad lineal, resulta:

$$H_l = \frac{B}{u} \qquad (3\text{-}17)$$

Resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil

Como se ha indicado al comienzo de este capítulo, a medida que el soluto se desplaza a través de la columna sus moléculas se transfieren, por un proceso reversible, desde la fase móvil hacia la fase estacionaria y desde ésta nuevamente hacia la fase móvil.
Este proceso no es instantáneo y para llevarse a cabo requiere de un tiempo determinado. En el proceso real, las moléculas de soluto más favorables a la interacción con la fase estacionaria son las más cercanas a ésta, mientras que las más alejadas demorarán más tiempo para que esta interacción tenga lugar. Como la fase móvil está en movimiento, las moléculas más alejadas de la partícula habrán viajado un determinado trayecto antes de que sean retenidas por la fase estacionaria, lo que resultará en una dispersión de la banda inicial.
La contribución de este efecto al ensanchamiento de banda será mayor cuanto mayor sea la retención del soluto. Así, será directamente proporcional a un factor dependiente de k' (fm), a la velocidad lineal de la fase móvil (u) y al diámetro de la partícula (dp), e inversamente proporcional al coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil (D_m):

$$H_i = f_m \; d_p^2 \; \frac{u}{D_m} \qquad (3\text{-}18)$$

Resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria

Este efecto es semejante al fenómeno de resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil y es más pronunciado en LLC (cromatografía de partición líquido-líquido), donde la fase estacionaria es una fina capa de líquido retenido sobre un soporte inerte. Las moléculas de soluto se retienen en la fase estacionaria y son luego devueltas a la fase móvil en un tiempo finito. Las moléculas de soluto próximas a la superficie serán devueltas a la fase móvil más rápidamente que las moléculas que difundieron profundamente, lo que dará lugar a un ensanchamiento de la banda original. El ensanchamiento será proporcional a una función del factor de capacidad (fs), al espesor de la fase estacionaria en LLC o a la profundidad del poro (df) e inversamente proporcional al coeficiente de difusión del soluto en la fase estacionaria (Ds).

$$H_i = f_s \; d_f^2 \; \frac{u}{D_s} \qquad (3\text{-}19)$$

Las constantes referidas a la transferencia de masa pueden agruparse para ser expresadas en términos de velocidad lineal. Como en los casos anteriores, la forma reducida de estos efectos resulta:

$$H_i = C \; u \qquad (3\text{-}20)$$

La combinación de los cuatro efectos descritos da lugar a la expresión final de la ecuación de Van Deemter:

$$H = d_f \quad \gamma + \lambda \quad \frac{D_m}{u} + f_m \quad d_p^2 \quad \frac{u}{D_m} + f_s \quad d_f^2 \quad \frac{u}{D_s} \qquad (3\text{-}21)$$

La que agrupada en función de la velocidad lineal resulta en:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \; u \qquad (3\text{-}22)$$

De la ecuación de Van Deemter pueden extraerse valiosas conclusiones. Se deduce que la HEPT será menor, lo que equivale a mayor N (y consecuentemente mayor eficiencia de la columna) en las siguientes condiciones:

- Cuanto menor sea el diámetro de la partícula. Este es un parámetro de gran importancia, como puede deducirse de su potencia 2 en el término C.
- Cuanto menor sea la viscosidad de la fase móvil (menor coeficiente de difusión).
- A mayor temperatura, porque ésta resulta en una disminución de la viscosidad de la fase móvil.
- Cuanto mejor sea el empaquetamiento del relleno, por la menor distancia entre partículas de fase estacionaria.
- Cuanto menor sea el espesor de la capa de fase estacionaria fija al soporte de relleno. Este factor no reviste actualmente mucha importancia, ya que el empleo de LLC está muy limitado y la fases ligadas en los modernos rellenos de fase ligada son del tipo monocapa.

La figura 3.8 muestra el mecanismo de los procesos de ensanchamiento de banda que hemos comentado. Como estos procesos ocurren simultáneamente su contribución individual no llega a observarse, aunque podríamos estimarlos (ver figura 3.9). Esta estimación es lógica e incluso intuitiva ya que es claro que el factor A (proceso multipaso), no depende de la velocidad lineal sino de la separación entre partículas (por ende, de la calidad del empaquetamiento) y debe originar una recta paralela a las abcisas. La difusión lineal (B/u) sólo se observa a caudales muy bajos y a valores altos no debería ser perceptible. Por último, los fenómenos de resistencia a la transferencia de masa, tanto respecto a la fase móvil como a la estacionaria (C.u), se agravan a mayor velocidad lineal de la fase móvil y no se aprecian a caudal cero ya que en este caso, el tiempo para llegar al equilibrio es infinito.

La figura 3.9 permite aún llegar a otras conclusiones. Puede deducirse del gráfico que existe una velocidad lineal (o un caudal, si resulta más sencillo de interpretar por el lector), a la cual la HEPT es mínima, es decir, la eficiencia es máxima. Caudales menores favorecen la difusión longitudinal y caudales mayores dificultan los procesos de transferencia de masa. La difusión de Eddy, como se ha visto, sólo podría mejorarse

Proceso Multipaso

Resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil

$$H = A + B/u + C.u$$

Difusión longitudinal

Resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria

Fig. 3.8. Procesos de ensanchamiento de banda intracolumnar.

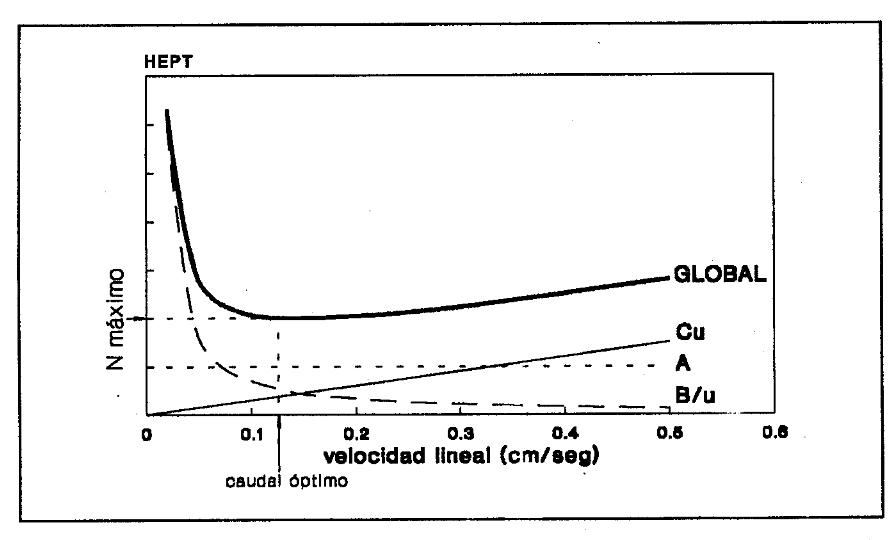


Fig. 3.9. Gráfico de Van Deemter para una columna hipotética. El trazado grueso corresponde a la suma de las contribuciones individuales al ensanchamiento de banda.

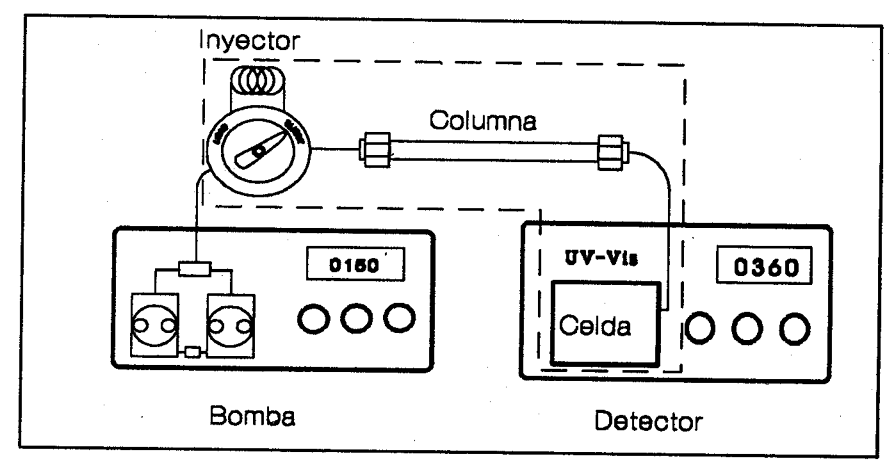


Fig. 3.10 Esquema de un cromatógrafo, en la cual se demarcan (por líneas discontinuas) las áreas responsables de los procesos de ensanchamiento de banda extracolumnares.

optimizando la calidad del empaquetamiento. Entonces, si el analista requiere mayor eficiencia o mayor número de platos teóricos, muchas veces es suficiente reducir el caudal hasta llegar a ese punto "óptimo", sin cambiar de método o de columna. Sin embargo, a pesar de existir un caudal óptimo, no necesariamente deberá trabajarse en esa condición, ya que si la resolución entre los componentes de la muestra fuera mayor de la mínima necesaria (y en general se trata que así sea), puede trabajarse a mayores caudales. De esta forma no se degrada seriamente la calidad de la separación, pero sí se reducen los tiempos de análisis.

Ensanchamiento de banda extracolumnar

En condiciones ideales, el ancho de banda sólo depende de los procesos ya descritos y que tienen lugar dentro de la columna cromatográfica. Sin embargo, varios componentes del equipo cromatográfico son responsables de un ensanchamiento adicional, lo que lleva a la pérdida de eficiencia. Por esta razón es importante verificar el diseño instrumental. Naturalmente, no tiene mucho sentido verificar el diseño "íntimo" de los componentes del cromatógrafo a menos que el objetivo sea la compra o modificación de un equipo. En general basta con controlar el "armado": longitud y tipo de tuberías, uniones, etc. De este modo, su efecto sobre la performance global podrá minimizarse.
Los procesos de ensanchamiento de banda extracolumnares pueden medirse en función de la varianza (σ^2) del pico y son producidos por tres fuentes de dispersión:

- El volumen de los componentes entre el inyector y la celda del detector, excluida la columna cromatográfica.
- El volumen de inyección.
- La constante de tiempo del detector (τ).

Así, la dispersión del pico estará representado por: **(3-23)**

$$\sigma_T^2 = \sigma^2_{columna} + \sigma^2_{tubos} + \sigma^2_{uniones} + \sigma^2_{detector} + \sigma^2_{inyección}$$

Donde σ_T^2 es la varianza total del pico, $\sigma^2_{columna}$ la varianza del pico generada por los procesos de ensanchamiento intracolumnares y σ^2_{tubos}, $\sigma^2_{uniones}$, $\sigma^2_{detector}$ y $\sigma^2_{inyección}$ la varianza producida por los procesos individuales de ensanchamiento extracolumnar en las tubuladuras, uniones, detector e inyección. Si llamamos σ^2_{ec} a todos los factores extracolumnares, podemos simplificar la ecuación (3-23) resultando:

$$\sigma_T^2 = \sigma^2_{columna} + \sigma^2_{ec} \qquad \textbf{(3-24)}$$

Según Novotny[11], la varianza intracolumnar está dada por:

$$\sigma^2_{columna} = (\pi \quad r^2 \quad \varepsilon_T)^2 \quad H \quad L \qquad \textbf{(3-25)}$$

y depende, como se ha visto antes de la altura del plato teórico (H), la longitud de la columna (L), el radio de la columna (r) y la porosidad (ε_T) total (0.85 en una columna bien empaquetada).

Es evidente que la influencia global de la dispersión extracolumnar depende de la dispersión intracolumnar. Dicho de otro modo, como la primera es constante, su "peso" sobre el resultado dependerá no sólo de su magnitud sino de la magnitud de la dispersión generada por la columna. Como se ha demostrado (ver ecuación 3-14), en el mismo cromatograma, a mayor retención corresponde mayor ancho de banda (mayor dispersión). Esto significa que el efecto negativo de los efectos extracolumnares será mayor en los picos menos retenidos (k' bajos). En general el efecto de la dispersión extracolumnar será mayor cuanto menor sea H (mayor N) y cuanto menor sea el radio de la columna.

Es así que los materiales de alta eficiencia (fast o high speed HPLC, que emplea rellenos de 3 μm de diámetro de partícula) y las microbore (partículas convencionales en columnas de 1 mm de diámetro interno) necesitan un mejor ajuste de los volúmenes muertos y, en lo posible, alejarse de valores bajos de k'.

Por el contrario, métodos poco eficientes (H altos, N bajos) y las columnas muy largas no son tan sensibles a los efectos extracolumnares.

Ensanchamiento de banda producido en el detector

Para que el eluído de la columna cromatográfica pueda ser evaluado debe pasar por la celda del detector, la cual tiene, naturalmente, un volumen finito. El detector puede contribuir de dos formas al ensanchamiento de banda, en función de su componente hidráulico (tubos de ingreso a la celda, volumen y geometría de la celda) y su componente electrónico (la velocidad de respuesta).

Evidentemente el volumen de esta celda debe ser pequeño, para que no vuelva a mezclar los componentes que fueron separados en la columna. En general, se diseña la celda del detector de modo que su volumen no sea mayor de 1/10 del volumen de los picos menos retenidos.

Tabla 3.II. Volúmenes de pico típicos en HPLC convencional (columna de 250-300 mm de longitud y 4 mm de diámetro interno) y microbore (250-300 mm y 1 mm de diámetro interno).

Retención	Columna Microbore	Columna Convencional
k' = 0	5 µl	100 µl
k' = 2	15 µl	300 µl
k' = 6	35 µl	700 µl

De la tabla 3.II surge que si el pico de interés tiene un k'=2 y se emplea una columna microbore el volumen de la celda no deberá ser mayor de 1.5 µl (las celdas típicas son de 1 µl). Si se emplean columnas convencionales, el mismo pico requeriría una celda no mayor de 30 µl. Las columnas "rápidas" elaboradas con material de 3 µm de diámetro de partícula producen picos más angostos que las convencionales y se ha sugerido[12] que ese aumento de eficiencia se aprovecha mejor si se modifica el sistema, en este caso, empleando celdas más chicas. Sin embargo, los detectores convencionales pueden emplearse sin reducción apreciable de la eficiencia si no se miden picos de k' muy bajos[13]. Además del volumen de celda debe considerarse su diseño, ya que celdas que induzcan flujos turbulentos son capaces de producir dispersión, independientemente del generado por su volumen.

La constante de tiempo (τ) de un detector indica, por su parte, la velocidad a la cual éste responde a un cambio instantáneo de la concentración del analito. Si la constante de tiempo es muy alta (respuesta lenta), un pico angosto podría "perderse", o achatarse, mezclándose con otro pico adyacente. Este problema no ocurre si la constante de tiempo es muy baja (respuesta rápida). Sin embargo, en este caso se obtiene una señal muy ruidosa. En general se obtiene una buena señal si la constante de tiempo es menor del 10% del ancho de pico a media onda. Por ejemplo, el pico de k'=0 de una columna convencional como la indicada en la tabla 3.II tiene un ancho de base de 100 µl. En un pico gaussiano este valor corresponde a 4 σ, de modo que 2 σ (el ancho a media onda) será 50 µl. A un caudal de 1.0 ml/min, la constante de tiempo para este pico debería ser de:

$\tau =$ (0.1 x 0.05 ml / 1 ml/min) x 60 s/min = 0.3 s

En el mismo caso, un pico de 300 µl (k'=2) necesitaría una constante de 0.9 segundos. En general, en cromatografía convencional una constante de 1 segundo resulta apropiada. Este valor incluso puede ser adecuado con columnas microbore ya que si bien los anchos de pico son menores, también lo es el caudal, típicamente, entre 2 y 50 µl/min.

La modalidad fast HPLC en cambio puede necesitar de detectores más rápidos, aunque, como puede comprobarse en la figura 3.11, del conocimiento de este problema puede sugerir el modo de minimizarlo. Es evidente que a medida que aumenta el ancho de banda intracolumnar, simplemente ajustando la retención (k'), la influencia de la constante de tiempo se ve reducida.

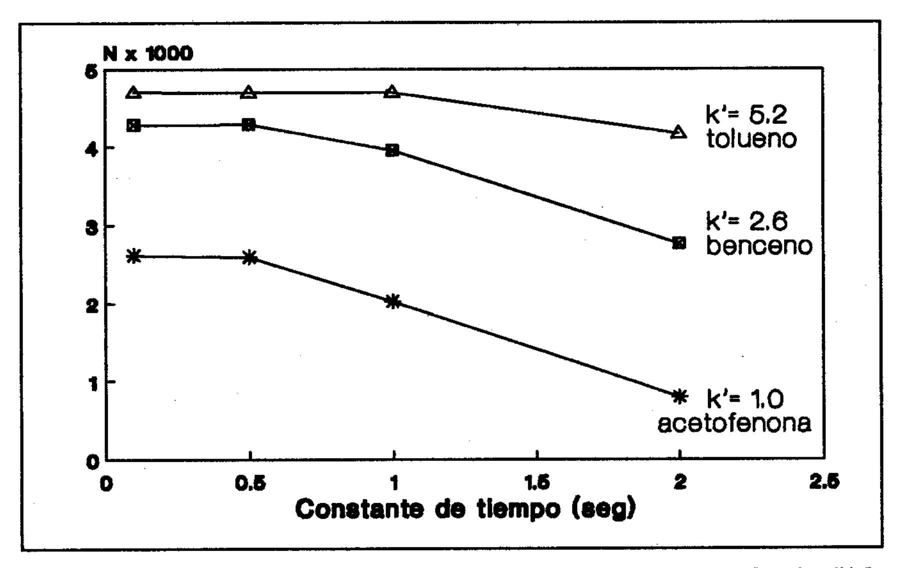


Fig. 3.11 Respuesta de un detector UV, a 254 nm, con celda de 12 µl. Columna: Supelcosil LC-18-DB 3 x 3, con partículas de 3 µm de diámetro, fase móvil: MeOH-H2O (60:40) a 1 ml/min (de referencia 13, gentileza de Supelco).

Ensanchamiento de banda producido por tuberías

Otra contribución al ensanchamiento de banda extracolumnar está dado por las tuberías y uniones, en particular las que conectan el inyector a la columna y las que van de ésta a la celda del detector.

La figura 3.12 muestra el efecto de añadir porciones de tubo de acero de longitud y diámetro interno variable en un sistema de fast HPLC, con una columna de 3.3 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno. Las conclusiones, previsibles de acuerdo a lo que hemos discutido son las siguientes:

- La dispersión es mayor a mayor longitud de tubería.
- La dispersión es mayor a mayor diámetro interno de tubería.
- El efecto de la dispersión producido por el agregado de tubería adicional es menos notorio a k' altos (picos más retenidos y por ende, más anchos).

En general en HPLC se usan dos tipos de tubuladuras, las de sección interna fina (por ejemplo 0.18, 0.20, 0.22 mm) y las de sección interna gruesa (por ejemplo 0.50, 0.70 mm). Se recomienda emplear las más delgadas para todas las conexiones entre inyector y detector, para disminuir su contribución al ensanchamiento de banda y las de mayor calibre para las restantes, de modo de no aumentar innecesariamente la presión del sistema. Naturalmente, si se conectan dos detectores en serie y las celdas soportan la presión generada, la conexión entre ambos también deberá hacerse con tubos de bajo diámetro interno.

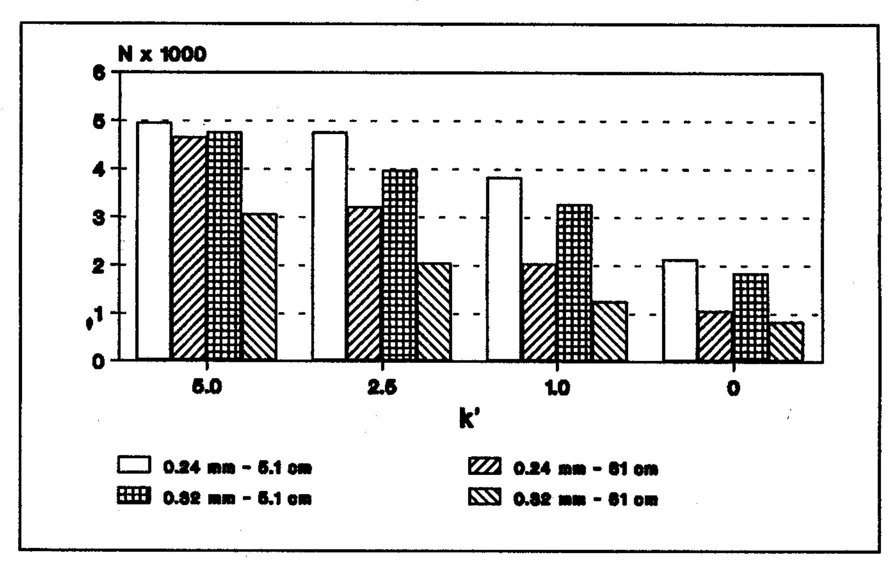


Fig. 3.12 Efecto del agregado de tubería en un sistema de Fast HPLC. Separación de Uracilo, Acetofenona, Benceno y Tolueno. Condiciones como en figura 3.11 (Adaptado de referencia 13. Gentileza de Supelco).

Por lo que hemos visto, se aconseja no emplear tubos excesivamente largos, ni conexiones innecesarias. Esto resulta más importante en fast HPLC y más aún con columnas microbore, en las cuales la columna misma suele conectarse directamente al inyector por uno de sus extremos y al detector por el restante, sin conexiones intermedias.

Ensanchamiento de banda producido por el volumen de inyección

Como se ha indicado, la muestra se introduce al sistema inyectando un volumen determinado de solución. Este volumen se escoge de modo que el analito pueda ser detectado y cuantificado, pero debe controlarse que no incida sensiblemente sobre el ensanchamiento de los picos. Según Novotny[14], el máximo volumen de inyección permisible está dado por:

$$V^2_{iny} = (\theta \;\; K \;\; \pi \;\; r^2 \;\; \varepsilon_T)^2 \;\; H \;\; L \qquad (3\text{-}26)$$

donde θ^2 es el incremento de varianza permitido (por ejemplo, si una varianza σ^2 del 5% debida al volumen de inyección resulta tolerable, θ^2=0.05), K es una constante dependiente del perfil de la inyección (las mayores diferencias se encuentran en inyectores no convencionales, splitters, etc). Asumiendo un perfil de inyección normal, K^2=12; r, H, L y ε_T corresponden al radio, altura del plato teórico, longitud y porosidad total de la columna. Nuevamente, el máximo volumen de inyección permisible dependerá de la

eficiencia de la columna, su radio y longitud.
Dolan[15] recomienda que el volumen de inyección no supere 1/6 del volumen del primer pico de interés (por ejemplo, no más de 50 µl para un pico de 300 µl -k'=2 de la tabla 3.II). El criterio de Novotny (ver tabla 3.III) es más estricto y recomienda un volumen no mayor de 17 µl para columnas convencionales y no más de 1.6 µl para microbore.
De todos modos, es interesante destacar que es posible inyectar volúmenes mucho mayores si la muestra se disuelve en un solvente más "débil" que la fase móvil. Por ejemplo, si trabajamos en fase reversa con una mezcla metanol-agua como fase móvil e inyectamos una muestra disuelta en agua, por efecto de este solvente débil los componentes de la muestra se concentrarán en la cabeza de la columna y recién serán eluídos cuando esta banda concentrada sea alcanzada por la fase móvil. De este modo, la dispersión que sería causada por el efecto del volumen de inyección se minimiza y sería posible inyectar un volúmen mayor.

Tabla 3.III. Máximos volumen de inyección para columnas convencionales y microbore según Novotny. Adaptado de referencia 14.

Tipo de columna	**I.D.** (mm)	**L** (mm)	**dp** (µm)	V_{iny} (µl)
convencional	4.6	250	5	17
microbore	1	1000	5	1.6

Referencias

1. Liquid Chromatography Terms and Relationships. ASTM (1979).
2. Recomendations on Nomenclature for Chromatography. Pure Appl. Chem. 37, 447, (1974).
3. Ettre S., J. Chromatogr. 220, 29, (1981).
4. Borman S., Anal. Chem. 59, 99A, (1987).
5. Krstulovic A., Colin H., Guiochon G., Anal. Chem. 54, 2438, (1982).
6. Wells M., Clark R., Anal. Chem. 53, 1341, (1981).
7. Snyder L.R., Kirkland J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2da. ed., cap. 2, J. Wiley, N.Y., 1979.
8. Bidlingmeyer B., Warren F. Jr., Anal. Chem. 56, 1583A, (1984).
9. Van Deemter J. y col., Chem. Eng. Sci., 5, 271, (1956).
10. Katz E., Ogan L., Scott R., J. Chromatogr. 270, 51, (1983).
11. Novotny M., Anal. Chem. 60, 500A, (1988).
12. Cooke N. y col., Anal. Chem. 54, 2277, (1982).
13. The Supelco Reporter VI(2), 6-7, (1985).
14. Novotny M., "Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development: An Introduction", Wainer I., Aster Pub.Co., cap. 1, Springfield, 1985.
15. Dolan J., Snyder L., "Troubleshooting LC Systems", Humana Press, NJ, USA, 1989.

Capítulo 4

Solventes

4.1 Introducción

La fase móvil en HPLC cumple un rol fundamental, ya que puede por sí misma modificar completamente la selectividad de las separaciones en fase normal y es, a la vez, el verdadero "motor" de las separaciones en fase reversa[1,2]. De hecho, ésta es la principal diferencia que existe entre la GC y la HPLC, porque en GC la fase móvil es simplemente un carrier de los solutos y su elección depende solamente del detector a utilizar. La única herramienta para modificar la selectividad de una separación es la columna y, por ello, suele utilizarse una columna para cada tipo de separación. Como contrapartida, en HPLC es posible lograr un número muy grande de diferentes separaciones con una columna, tan sólo variando la composición de la fase móvil.

4.2 Propiedades de los solventes

Se debe tener en cuenta que no todos los solventes son adecuados para trabajar en HPLC, ya que la condición de estado líquido no es suficiente por sí misma para que una sustancia se pueda emplear como fase móvil. Un solvente apropiado para HPLC debe cumplir con algunos requisitos, entre los cuales podemos destacar los siguientes:

- Alto poder solubilizante de las muestras
- Baja reactividad
- Compatibilidad con el detector utilizado
- Adecuado punto de ebullición
- Baja viscosidad
- Seguridad
- Alto grado de pureza

Todas estas características se detallarán a continuación conjuntamente con las propiedades químicas que se deben evaluar para seleccionar un solvente.

Poder solubilizante de las muestras

Es evidente que en LC, la muestra a inyectar debe estar completamente disuelta. Es conveniente que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil. Si esto no es posible, y de hecho muchas veces no lo es, debe tenerse en cuenta tanto la miscibilidad entre el solvente de disolución y la fase móvil, como la posible precipitación de componentes de la muestra al estar en contacto con la fase móvil. Es así que, cuando se trabaja con muestras de origen biológico, se debe, en primera instancia, eliminar las

proteínas, pues precipitan en contacto con los solventes orgánicos presentes en la fase móvil, pudiendo bloquear el inyector del equipo de HPLC o dañar irreversiblemente las columnas. En casos no tan extremos, la insolubilidad de las muestras en la fase móvil puede acarrear otros problemas. Supongamos que la muestra se disuelve totalmente en metanol, y el solvente de elución es una mezcla de metanol y agua. En este caso, es posible que los compuestos menos solubles precipiten en la cabeza de la columna, lo que se visualiza por un aumento de la presión al cabo de varias inyecciones. El problema puede agravarse si la precipitación ocurre en un sector central de la columna, ya que si el caudal del solvente debe interrumpirse, o no puede restablecerse, la columna no podrá ser lavada ni recuperada.
Otro inconveniente derivado del empleo de un solvente de muestra diferente de la fase móvil está dado por la aparición de picos extraños al cromatograma verdadero, debidos a la señal del mismo solvente (en general en el volumen muerto), o bien a la elución de impurezas retenidas en la columna.

Reactividad

Los solventes con un elevado grado de reactividad no se utilizan en HPLC, ya que pueden reaccionar con la muestra, la fase estacionaria, o los componentes del equipo cromatográfico. Así por ejemplo no se utilizan olefinas, nitrocompuestos, aldehídos ni cetonas.
Los solventes con grupos cetónicos deben evitarse particularmente con columnas de fase ligada a grupos amino, dado que el producto de reacción, una base de Schiff, es estable y la degradación ocasionada es irreversible.

Compatibilidad con el detector utilizado

Teniendo en cuenta que el detector de HPLC más difundido es el espectrofotométrico, es habitual elegir un solvente "transparente" a la longitud de onda de trabajo. Esa transparencia puede evaluarse por la longitud de onda de corte λc, es decir, la longitud de onda a la cual la absorbancia del solvente, en una cubeta de 10 mm de paso óptico, es igual a 1 unidad de absorbancia empleando aire como referencia (ver tabla 4.I). Por ejemplo, si un solvente tiene su longitud de corte a 254 nm, no puede utilizarse a 230 nm pero sí a 280 nm. Solventes como el tolueno (λc: 285 nm) y acetona (λc: 330 nm) prácticamente no se emplean, ya que la señal de fondo que producen en un detector convencional (absorción de base, debida a la fase móvil) es tan alta que impide, no sólo la medición de los compuestos eluídos, sino incluso el ajuste de cero del instrumento. Como contrapartida, el metanol (λc: 205 nm) y el acetonitrilo (λc: 190 nm) son los solventes más empleados en HPLC.
Sin embargo, la longitud de onda de corte del solvente puro no es el único parámetro a considerar, ya que la presencia de impurezas puede aumentar considerablemente el valor tabulado. Por ejemplo, el hexano grado analítico normalmente está contaminado con

trazas de benceno, y no puede utilizarse como fase móvil en HPLC a longitudes de onda menores a 250 nm.

SOLVENTE	CORTE UV nm	R.I. 25°C	P.E. °C	VISCOSIDAD cps a 25°C
Agua		1.333	100	0.89
Acetona	330	1.356	56	0.30
Acetonitrilo	190	1.341	82	0.34
Ciclohexano	200	1.423	81	0.90
Ciclopentano	200	1.404	49	0.42
Cloroformo	245	1.443	61	0.53
Cloruro de Metileno	233	1.421	40	0.41
Dimetilsulfóxido	268	1.477	189	2.00
Dioxano	215	1.420	101	1.20
Etanol	210	1.359	78	1.08
n-Heptano	195	1.385	98	0.40
n-Hexano	190	1.372	69	0.30
Isooctano	197	1.389	99	0.47
Isopropanol	205	1.384	82	1.90
Metanol	205	1.326	65	0.54
n-Pentano	195	1.355	36	0.22
n-Propanol	240	1.385	97	1.90
Tetrahidrofurano	212	1.405	66	0.46
Tolueno	285	1.494	110	0.55

Tabla 4.I. Propiedades de los solventes habituales de HPLC.

Punto de ebullición

En general, se prefieren los solventes de punto de ebullición intermedio. Si el solvente tiene bajo punto de ebullición, su volatilidad es alta y la composición de la fase móvil puede variar durante la jornada de trabajo. Por otra parte, el ciclo de descompresión en una bomba reciprocante puede llevar a la formación de burbujas, lo que se asocia con irregularidades del caudal, atascamiento de pistones, etc. Por el contrario, un alto punto de ebullición se correlaciona, por lo general, con alta viscosidad. Esto último es sinónimo de alta presión (con ello menor vida media de los componentes del instrumento) y baja eficiencia. Sin embargo, un solvente viscoso puede resultar muy útil para modificar la selectividad del sistema, y puede ser apropiado si se emplea en baja proporción.

Viscosidad

Como se ha visto, la viscosidad (η) de los solventes está estrechamente relacionada con la presión del sistema. Con solventes viscosos, la eficiencia de la separación es menor debido a que el coeficiente de difusión de la muestra se reduce, y se dificulta la transferencia de masa del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

El aumento de la viscosidad reduce la permeabilidad de la columna, y al mismo caudal la presión será mayor que la producida por un solvente de baja viscosidad. Por ese motivo, se prefiere evitar el uso de solventes de alta viscosidad como dimetilsulfóxido (η: 2.00 cps) o isopropanol (η: 1.90 cps).

La presión en una columna se puede calcular[3] como:

$$P = \frac{2.1 \ f \ L}{dp^2 \ D^2} \tag{4-1}$$

donde P es la presión medida en atmósferas que se obtiene con agua a un caudal de 1 ml/min, f es un factor que vale 1000 para columnas de acero, L es la longitud de la columna medida en cm, dp es el tamaño de las partículas expresada en µm y D es el diámetro interno de la columna medido en mm.

Para determinar la presión utilizando otro solvente, basta relacionar la presión en agua con la relación de las viscosidades entre el agua y el solvente en cuestión.

En el caso de mezclas de solventes, la viscosidad de la mezcla, depende preferentemente de la viscosidad del solvente menos viscoso[4]. Sin embargo, esto no se cumple en el caso de mezclas de solventes de fuerte asociación como las que habitualmente se utilizan en RPLC, donde la viscosidad de la mezcla resulta mucho más elevada que la de los componentes puros. Por ejemplo la viscosidad máxima de una mezcla MeOH-agua se da para un 40 % de metanol, y en la mezcla AcN-agua, para un 10 % de acetonitrilo.

Seguridad

Como en cualquier método analítico, en HPLC debe evitarse el empleo de solventes que, por sus características (en particular inflamabilidad y toxicidad), representan un serio riesgo para el operador. En general, se recomienda no utilizar solventes de alto grado de toxicidad (ver tabla 4.II) como el sulfuro de carbono, benceno o tetracloruro de carbono y tomar precauciones durante la manipulación de los otros solventes.

SOLVENTE	ppm	SOLVENTE	ppm
Acetato de Etilo	400	Dioxano (en piel)	100
Acetona	1000	Eter Etílico	400
Acetonitrilo	40	Eter Isopropílico	500
Acido Acético	10	Etilamina	10
Acido Fórmico	5	n-Heptano	500
Alcohol Isopropílico	400	n-Hexano	500
Alcohol Propílico	200	Isopropilamina	5
Amoníaco	50	Metanol	200
Benceno	10	Sulfuro de Carbono	20
Cloroformo	50	Tetracloruro de Carbono	10
Cloruro de Metileno	500	Tetrahidrofurano	200
Dietilamina	25	Tolueno	200
Dimetilamina	10	Trietilamina	25

Tabla 4.II. Límites de concentración para gases según OSHA. Exposición máxima permitida. (8 hs promedio ponderado)

Pureza

Los solventes empleados en HPLC deben cumplir, como se ha visto, ciertos requisitos de calidad. La presencia de impurezas puede, por un lado, inducir modificaciones de la selectividad de la fase móvil, y por otro contribuir a una señal de base importante en el detector (absorbancia, reacciones de óxido-reducción, etc).

La utilización de solventes de menor calidad sin posterior purificación puede parecer económicamente tentadora, pero los posibles problemas asociados resultan en general en mayores costos.

A veces no es posible obtener comercialmente un solvente de buena pureza. En estos casos pueden emplearse solventes de menor calidad, pero se recomienda una purificación previa. Como el método de purificación depende del tipo de solvente, se describirá brevemente cada caso particular.

Propiedades químicas

La separación cromatográfica se produce por un balance de afinidades entre la muestra, la fase móvil y la fase estacionaria. Las propiedades químicas de la fase móvil son las que establecen el tipo y fuerza de interacción entre el solvente y la muestra, y en consecuencia, son determinantes de la separación. La tabla 4.III representa una muestra del tipo y magnitud de estas propiedades para algunos solventes, que pueden definirse como:

- ***índice de polaridad.*** Es la resultante de todas las propiedades químicas e intenta medir

cuantitativamente la "fuerza" de interacción de los solventes frente a solutos polares.

- ***fuerzas dispersivas.*** Indican la polarizabilidad (facilidad de polarizarse) de una molécula y aumentan con el número de electrones de la misma y con la distancia de éstos al núcleo.
- ***capacidad aceptora o donadora de protones.*** Es una medida de la capacidad de las moléculas a intercambiar protones. Las sustancias que aceptan protones se denominan bases de Lewis, y las que los donan, ácidos de Lewis.
- ***momento dipolar.*** Se refiere a la capacidad de una molécula para formar dipolos permanentes y está estrechamente relacionado con la constante dieléctrica del solvente.

La selectividad de los solventes no resulta, como puede verse, de una única propiedad, sino de la suma de todas sus propiedades químicas. La contribución de cada tipo de interacción, en calidad y magnitud, sirvió a Snyder para agrupar los solventes de similar comportamiento en un diagrama triangular (ver figura 11.9), de indudable utilidad para la elección de solventes en función de su selectividad.

4.3 Solventes y aditivos de fase reversa

Las fases móviles de fase reversa están constituídas por mezclas de solventes polares, en general agua, y un modificador orgánico (metanol, acetonitrilo, THF), con o sin el agregado de aditivos (sales inorgánicas o reactivos de apareamiento iónico). Dioxano y THF se mezclan tanto con el agua como con solventes no polares (cloroformo, hexano), y pueden considerarse tanto solventes de fase normal como de fase reversa.

Agua

El agua es, indudablemente, el solvente más utilizado en HPLC. Puede adquirirse comercialmente agua de calidad cromatográfica, o bien puede ser purificada por el mismo usuario, de hecho, un buen número de cromatografistas así lo hacen.

El agua destilada y desionizada que, a los fines prácticos, es útil para muchas de las aplicaciones de laboratorio, puede encontrar serias limitaciones en HPLC. La razón de ello reside en la presencia de sustancias orgánicas (ftalatos, cloraminas, etc) que no se eliminan por el tratamiento aplicado. Las columnas de fase reversa, muy hidofóbicas, tienen afinidad por compuestos de baja polaridad. Como consecuencia, la operación con sistemas isocráticos con fases móviles muy polares, conduce a su retención en la fase estacionaria. En este caso las impurezas pueden actuar como verdaderos "recubrimientos

Solvente	Indice de Polaridad	Fuerza Dispersiva	Donador de Protones	Aceptor de Protones	Momento Dipolar	Grupo
Isooctano	- 0.4	- 0.10	0.00	0.00	0.00	-
n-Hexano	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	-
Eter Isopropílico	2.2	- 0.15	0.54	0.11	0.35	1
Tolueno	2.3	0.00	0.32	0.24	0.44	7
Eter Etílico	2.9	- 0.22	0.55	0.11	0.34	1
Cloruro de Metileno	3.4	0.20	0.34	0.17	0.49	5
n-Butanol	3.9	- 0.10	0.53	0.21	0.26	2
Isobutanol	3.9	- 0.30	0.55	0.23	0.22	2
n-Propanol	4.1	- 0.15	0.54	0.19	0.27	2
Tetrahidrofurano	4.2	- 0.15	0.41	0.19	0.40	3
Acetato de Etilo	4.3	0.00	0.34	0.25	0.42	6
Isopropanol	4.3	- 0.30	0.54	0.20	0.26	2
Cloroformo	4.3	- 0.10	0.28	0.39	0.33	8
Metil Etil Cetona	4.5	0.00	0.36	0.17	0.47	6
Dioxano	4.8	0.08	0.38	0.21	0.41	6
Etanol	5.2	- 0.23	0.51	0.21	0.28	2
Acetona	5.4	- 0.10	0.36	0.24	0.40	6
Acetonitrilo	6.2	0.04	0.33	0.26	0.41	6
Metanol	6.6	0.03	0.51	0.19	0.30	2
Formamida	7.3		0.40	0.28	0.32	4
Agua	9.0		0.40	0.34	0.26	-

Tabla 4.III. Lista de propiedades de solventes habituales de HPLC. (De referencia 5, con permiso del editor)

líquidos" de la columna[6], modificando su selectividad. Si en ese momento la fase móvil se cambia por otra de menor polaridad, o si la muestra se inyecta con un solvente menos polar (por ejemplo, disuelta en metanol puro), las impurezas orgánicas eluyen como picos espurios, interfiriendo en el cromatograma.

El problema se complica aún más si se utilizan gradientes de elución. En este caso las impurezas quedan retenidas y luego, al aumentar la concentración del solvente orgánico, eluyen como picos espurios.

La calidad del agua para cromatografía puede evaluarse usando este mismo principio[7-9], percolando unos 100 ml del agua en ensayo a través de una columna de C18, y desarrollando a continuación un gradiente lineal hasta 100 % de MeOH o AcN y manteniendo las condiciones finales durante 10 o 15 minutos. El eluato se monitorea a 254 nm, con una sensibilidad de, por ejemplo, 0.1 AUFS. En la figura 4.1 puede verse el resultado obtenido para agua desionizada y destilada, evidentemente inadecuada para

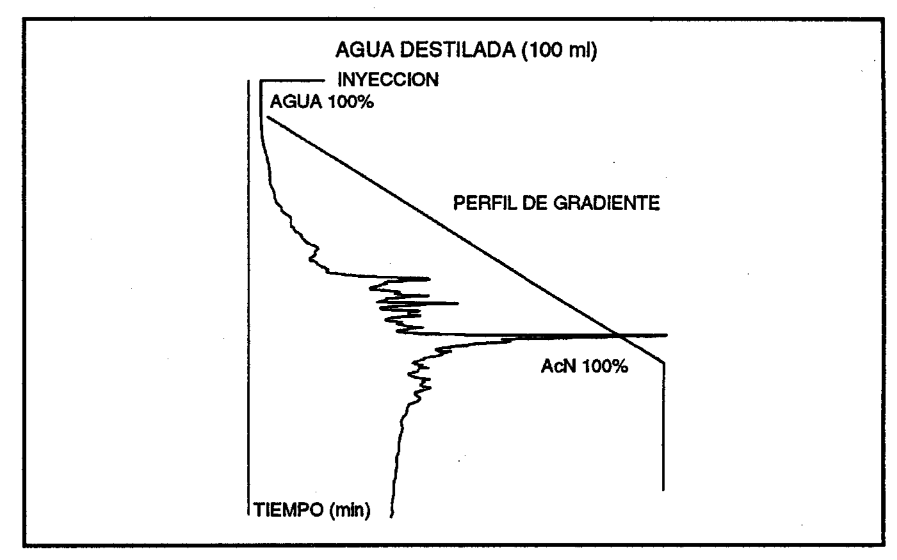


Fig. 4.1. Cromatograma de un agua desionizada y destilada con gradiente lineal de 0 a 100% de AcN en 15 minutos según se describe en el texto.

HPLC con gradiente de elución, pero en ese caso en particular, apta para uso medicinal. La preparación de agua cromatográfica, completamente libre de sustancias orgánicas, no es sencilla. Algunos métodos son:

- ***Sistemas de purificación con cartuchos.*** Se parte de agua previamente tratada (desionizada o destilada), que se hace pasar, por medio de una pequeña bomba, a través de una serie de cartuchos que contienen carbón activado y resinas mixtas de intercambio iónico. Finalmente el agua se filtra por membrana de 0.2 µm. Estos sistemas producen agua de muy alta calidad que es controlada por la medida de su resistividad.
- ***Destilación doble con permanganato de potasio***[10]. Mediante este método se logra destruir completamente los compuestos orgánicos presentes.
- ***Pasaje a través de columnas o cartuchos.*** Estos cartuchos o columnas, actúan reteniendo las sustancias orgánicas presentes en el agua y pueden estar rellenos de diversos materiales, por ejemplo:
  - ❑ Cartuchos Lobar (Merck), rellenos con Lichroprep RP-8 con tamaño de 40 a 63 µm[11].
  - ❑ Cartuchos Norganic (Waters Assoc.), rellenos con una resina depuradora.
  - ❑ Columnas de C18 en este caso, como la finalidad no es la resolución sino simplemente la retención, puede emplearse una columna analítica descartada.
  - ❑ Columnas de Porapak Q (copolímero de estireno y divinilbenceno).

Metanol

El metanol es el modificador orgánico más utilizado en fase reversa, en mezclas con agua o buffers. Por su mayor poder disolvente de sales y reactivos de apareamiento iónico, se lo prefiere frente al acetonitrilo en IPC o cuando es necesario utilizar altas concentraciones salinas. Es poco tóxico y fácil de purificar industrialmente, siendo el solvente orgánico de grado HPLC más barato. Sus principales desventajas con respecto al acetonitrilo residen en que genera presiones algo mayores y tiene mayor afinidad por el oxígeno.

Acetonitrilo

El acetonitrilo tiene, por sus propiedades químicas, una selectividad muy diferente a la del metanol, y constituye, en general, la primer alternativa ensayada cuando se busca cambiar la misma. El solvente de calidad HPLC se comercializa puro, es decir, sin conservadores. Se debe almacenar al abrigo de la luz y bien cerrado porque es muy higroscópico. Su baja longitud de onda de corte (190 nm) lo convierte en el solvente de elección cuando se debe trabajar a longitudes de onda cortas. Es un solvente caro por las dificultades que presenta su purificación. Se lo obtiene como subproducto de síntesis del acrilonitrilo, materia prima para la producción de cauchos sintéticos y plásticos.

$CH_2{=}CH{-}CH_3 \xrightarrow{O_2} CH_2{=}CH_2{-}CHO \xrightarrow{NH_3} CH_2{=}CH{-}CH{=}NH \xrightarrow{O_2} CH_2{=}CH{-}CN + CH_3{-}CH_2{-}CN$

Propileno — Acroleina — Acrilonitrilo — Acetonitrilo

La síntesis consiste en la oxidación al aire, a unos 450 °C, de propileno y amoníaco en presencia de óxidos de Bismuto y de Molibdeno como catalizadores. Por lo tanto, las impurezas probables del acetonitrilo serán acrilonitrilo y sus subproductos. Carlsen y col.[12], por medio de estudios con GS-MS, encontraron impurezas de acrilonitrilo, propionitrilo, alcohol alílico y benceno. Estos autores sugieren para su purificación una destilación con octanoato de sodio en octanol para eliminar el acrilonitrilo seguido de una destilación en medio ácido sulfúrico para eliminar el alcohol alílico y benceno. Por último el solvente obtenido se seca en una columna de alúmina activada y se envasa en recipientes secos. El rendimiento de este proceso es del 70 % obteniéndose un solvente equivalente a un grado espectrofotométrico.

Tetrahidrofurano

El tetrahidrofurano (THF), es un solvente que tiende a formar rápidamente peróxidos, por lo cual se lo suele comercializar con antioxidantes. Los antioxidantes más utilizados son el butilhidroxitolueno (BHT) y la hidroquinona. Estos compuestos tienen una elevada absorción UV por lo cual el THF estabilizado no debe utilizarse con el detector UV. Puede

utilizarse con el detector de índice de refracción, teniendo en cuenta la posible modificación de la selectividad inducida por la presencia del conservador. Sin embargo la presentación habitual del THF grado HPLC no contiene estabilizantes. En este caso, es preferible adquirir envases pequeños, que deben utilizarse inmediatamente luego de su apertura. Si no se consume el contenido total del envase, se recomienda crear una cámara de nitrógeno antes de volver a cerrar. De esta manera, se evita que el oxígeno atmosférico oxide el resto de solvente. El THF puede analizarse antes de ser usado para comprobar la ausencia de peróxidos. Un ensayo apropiado consiste en mezclar volúmenes iguales del solvente y del reactivo vanadio-ácido sulfúrico (0.1 g de V_2O_5 + 2 ml H_2SO_4 + agua hasta 50 ml). La presencia de peróxidos se revela por el viraje al rojo de la mezcla. Otra posibilidad es emplear el ensayo de peróxidos en éteres de las normas ACS[13], con cloruro de titanio en ácido clorhídrico al 20 %. Este reactivo desarrolla color amarillo en presencia de peróxidos, y puede cuantificarse con un estándard de peróxido de hidrógeno por lectura a 410 nm.
En el caso de que el ensayo de positivo, los peróxidos se podrán eliminar por pasaje a través de una columna de alúmina[14] o por destilación. La alúmina empleada debe descartarse, **previamente humectada, y cuidando de que no sea calentada.** Si se opta por la destilación debe tenerse en cuenta que toda destilación de éteres **debe hacerse en presencia de algún reductor**, por ejemplo el sulfato ferroso.

Dioxano

El dioxano tiene una selectividad semejante al tetrahidrofurano, pero su alta viscosidad hace que habitualmente no se emplee en HPLC, salvo como aditivo en pequeñas proporciones.

Aditivos: Sales y reactivos de IPC

Numerosos métodos cromatográficos requieren el uso de sales en la fase móvil, generalmente para el control y regulación del pH o de la fuerza iónica. Estos aditivos, al igual que los solventes, deberán tener un alto grado de pureza. En caso de no contar con reactivos lo suficientemente puros, pueden purificarse por recristalización o en casos más complejos, por pasaje a través de una columna de Porapak Q o C18, de intercambio iónico[15] o de carbón activado.
Los **fosfatos** son muy usados en cromatografía de fase reversa como sales de sodio o potasio debido a su baja absorción UV aún a longitudes de onda cortas. Los buffers de **acetato** o de **citrato** se utilizan en menor grado. El primero porque presenta una alta absorción al UV y el segundo porque se compleja con la sílice de las columnas reduciendo su vida útil.
Si se desea recuperar el analito separado por LC, es recomendable el uso de buffers de **trifluoracetato** debido a que es muy volátil y puede ser eliminado por aplicación de calor y vacío. Con este mismo fin se podría utilizar buffers de **formiato** pero su uso no es

recomendable dado que se ha informado[16] que ataca al acero inoxidable.
Las soluciones que contienen aditivos deben prepararse el día de uso, aunque algunas pueden almacenarse en soluciones concentradas. En este caso, debe indicarse la fecha de preparación en el rótulo del envase, y descartarse si se observara alguna alteración.
Los modificadores orgánicos (metanol, acetonitrilo, etc) actúan como inhibidores del crecimiento bacteriano. Sin embargo, las fases móviles empleadas en GFC e IEC son, en general, soluciones acuosas con agregado de sales inorgánicas. Estas soluciones representan un buen medio para el crecimiento de microorganismos, y no deben almacenarse, ni dejarse durante mucho tiempo estancas en el equipo. En estos casos, el crecimiento bacteriano puede inhibirse por agregado de azida sódica al 0.005 %[17].
No se recomienda el uso de **sales de haluros y sus ácidos** ya que atacan al acero inoxidable. En el caso de que deban usarse, puede pasivarse el acero bombeando ácido nítrico al 20-50 % a través de todo el sistema (sin precolumna, guardacolumna y columna) durante unos 20 minutos[6]. Luego del ácido, se bombea agua hasta neutralidad, se incorpora la columna y se establece el caudal con el solvente apropiado. Si el trabajo con este tipo de sales es habitual, se recomienda emplear equipos sin componentes de acero inoxidable, el que puede reemplazarse por titanio y PTFE.
Las **aminas** se utilizan habitualmente para reducir el tailing de los picos de sustancias de carácter básico. Las alquilaminas de uso más común son la trietilamina, etilamina, dietilamina y dibutilamina, en bajas concentraciones (1 - 20 mM).
Los **ácidos** más utilizados son el acético y el fosfórico. Se los emplea generalmente para controlar el pH en RPLC de supresión iónica. De éstos, es preferible el fosfórico por su baja absorción UV.
Otros aditivos corrientes son los **reactivos de apareamiento iónico**, empleados para el análisis de sustancias orgánicas iónicas o ionizables. Básicamente, existen dos tipos de reactivos de apareamiento iónico: las sales de tetraalquilamonio empleadas para el análisis de solutos ácidos y los alquilsulfonatos, para los solutos básicos. En ambos casos, se emplean en baja concentración, entre 1 y 20 mM. Tanto las sales de amonio cuaternario como los alquilsulfonatos pueden conseguirse comercialmente con buen grado de pureza. Se debe tener presente que al usar estos reactivos, las columnas quedan "marcadas" debido a que no se logra eliminarlos completamente mediante el proceso de lavado, quedando modificada la superficie de las mismas y consecuentemente, su selectividad. Por esta razón, se recomienda que las columnas utilizadas con estos aditivos no se empleen en la modalidad "regular" de RPLC, ya que el lavado es insuficiente para remover completamente el reactivo adsorbido al relleno, y la selectividad de estas columnas varía en forma permanente.
El **laurilsulfato de sodio** merece un tratamiento aparte debido a que, normalmente, está contaminado con homólogos de cadena más corta o más larga, alcoholes libres y electrolitos. Si debe emplearse con buffers de fosfatos, es preferible el uso de sales de sodio y no de potasio. Se ha reportado[18] la precipitación de las impurezas del laurilsulfato de sodio en presencia de iones potasio provenientes del buffer de fosfatos en concentraciones tan bajas como 3.5 mM.

4.4 Solventes de fase normal

En cromatografía de fase normal, donde se emplean solventes no polares, el problema más frecuente es la desactivación de la columna de sílice o alúmina por adsorción de agua. El agua adsorbida es responsable de los mecanismos mixtos de retención (partición y adsorción) y produce cambios profundos en la retención y selectividad. Los solventes no polares que se utilizan en NP suelen tener trazas de agua. Si bien, debido a la baja solubilidad, estas cantidades son muy pequeñas (por ejemplo 0.09 % en cloroformo, 3.25% en acetato de etilo a saturación), el agua resulta ser muy afín a la columna y comienza a concentrarse en la superficie del material de relleno durante el transcurso del trabajo.

El proceso de adsorción del agua es, afortunadamente, reversible. Para eliminar el agua de los solventes, se puede utilizar un desecante como el sulfato de sodio anhidro, la alúmina básica o tamices moleculares de 4 Å. Estos tamices se pueden volver a usar luego del secado, pero únicamente con el mismo tipo solvente[19], y siempre que no se trate de un éter, en cuyo caso puede haber retenido peróxidos, que pueden producir explosiones al calentarse. Un método de reactivación (desecación) "in situ" de las columnas de sílica consiste en percolar 2,2-dimetoxipropano (DMP) a través de la columna de sílice[20]. Este reactivo reacciona químicamente con el agua en presencia de un catalizador ácido (acético) formando acetona (que puede emplearse para monitorear la reacción con un detector UV) y metanol:

$$CH_3-\underset{OCH_3}{\overset{OCH_3}{\underset{|}{\overset{|}{C}}}}-CH_3 + H_2O \longrightarrow \underset{CH_3}{\overset{CH_3}{\underset{|}{\overset{|}{C}}}}=O + CH_3 \cdot OH$$

Dimetoxipropano — Acetona

En líneas generales, se percolan unos 10 volúmenes de columna de una solución al 2.5% V/V de DMP en hexano con un 2.5 % V/V de ácido acético. Se continúa con unos 10 volúmenes de columna de cloruro de metileno, para eliminar el ácido acético, y por último hexano.

Otro método, más laborioso, consiste en eluír progresivamente una serie de solventes de polaridad decreciente. Este proceso es habitual luego de la desactivación que se produce al regenerar una columna de fase normal. Como los contaminantes muy retenidos son, en general, muy polares, el lavado se efectúa con solventes de polaridad creciente. Por ejemplo, se percola con unos 80 ml de heptano, cloroformo, acetato de etilo, acetona,

etanol y por último agua. La columna queda, naturalmente, desactivada por adsorción de agua, y se reactiva percolando con los mismos solventes, en sentido inverso.

Eteres

Los éteres etílico, propílico e isopropílico tienen una alta presión de vapor, y son altamente inflamables. Por otra parte, son susceptibles de formar peróxidos, especialmente cuando son anhidros. Su empleo está por ello muy limitado en HPLC, aunque la selectividad que aportan impide sean descartados como solventes de elución. Una alternativa menos riesgosa consiste en emplear metil-terbutil éter.

Hidrocarburos halogenados

Por lo general todos los compuestos halogenados pueden contener trazas de ácido clorhídrico o bromhídrico, muy reactivos frente al acero inoxidable. Estos contaminantes pueden eliminarse por pasaje a través de una columna de alúmina.
Las mezclas de hidrocarburos halogenados con éteres y/o acetona son particularmente perjudiciales. Se ha reportado[21,22] que tanto el tetracloruro de carbono como el cloroformo, en mezclas con tetrahidrofurano, acetona, dietiléter y alcohol isopropílico corroen al acero inoxidable, mientras que la corrosión no tiene lugar cuando se utilizan estos solventes en forma individual. El mecanismo de ataque no fue dilucidado, pero podría deberse a los procesos autooxidativos de los éteres, formación de eteratos metálicos y radicales libres del tipo Cl_3C^* inducidos por la presencia de los peróxidos. De cualquier modo, está claro que este tipo de mezclas deben evitarse y, en caso de necesidad, se prepararán en forma inmediata previo al uso y **nunca** se dejarán estancadas en el equipo.
El **cloruro de metileno** es uno de los hidrocarburos halogenados más estables. Su degradación térmica en aire seco se produce a temperaturas mayores a los 120 °C con producción de ácido clorhídrico y trazas de fosgeno. La degradación se inhibe con trazas de compuestos fenólicos o amileno.
El **cloroformo** se puede descomponer lentamente a la luz, en presencia o no de aire, formando fosgeno y ácido clorhídrico.

$$Cl_3CH \xrightarrow{[O]} Cl_3COOH \xrightarrow{[-H_2O]} Cl_3CHO \longrightarrow \underset{\text{fosgeno}}{Cl_2CO} + HCl$$

Para evitar esta descomposición el cloroformo se comercializa con el agregado de etanol como estabilizante en concentraciones de 0.5 a 1.0 %. En NP la presencia del etanol modifica la polaridad y selectividad de la fase móvil, por lo que los cromatogramas obtenidos utilizando cloroformo con o sin estabilizador pueden diferir. Para eliminar el etanol, se lava el cloroformo con agua y se seca con sulfato de sodio anhidro, alúmina

básica o bien con tamices moleculares de 4 Å.
El **tetracloruro de carbono** prácticamente no se utiliza en HPLC, dado que es muy sensible a la ruptura oxidativa por exposición al aire, humedad o luz y, además, es un solvente sumamente tóxico.
Glajch, Kirkland y Schindel[23] recomiendan un nuevo solvente de fase normal, como alternativa a los alcanos, el **1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoretano (FC-113)**. Este solvente se caracteriza por su baja toxicidad, alto grado de pureza y buena transparencia UV (corte a 231 nm) con una fuerza de elución comparable a la del n-hexano.

Hidrocarburos alifáticos

Los hidrocarburos alifáticos son solventes muy transparentes a bajas longitudes de onda y poco viscosos. Debido a estas propiedades son especialmente adecuados para trabajar en HPLC. Desafortunadamente suelen contener trazas de olefinas o benceno los que dificultan su empleo por debajo de los 260 nm. La eliminación de olefinas puede efectuarse por pasaje a través de una columna de sílice impregnada con 10 % de nitrato de plata (la sal de plata puede incorporarse en solución acuosa a la sílica, que luego se seca a 125°C). Con una columna de 120 x 5 cm pueden eluirse por gravedad fracciones de 250 ml, controlando al UV la pureza del solvente obtenido. Otros métodos[24] consisten en el tratamiento con ácido sulfúrico y posterior pasaje a través de una columna de alúmina básica.

4.5 Preparación de las fases móviles

Naturalmente, el trabajar con solventes de alto grado de pureza, implica también el empleo de materiales volumétricos muy limpios. Un factor a tener en cuenta es la posible contracción de volumen, que se produce al mezclar solventes muy polares. El caso de la mezcla de metanol y agua es clásico: si se mezclan 50 ml de cada uno de ellos, se obtiene un volumen final de aproximadamente 98 ml. Por esta razón, si se debe preparar una mezcla de por ejemplo 50:50 Metanol:Agua no es correcto medir en probeta los 50 ml de agua y llevar a volumen con metanol, ya que la relación inicialmente prevista será distinta a la obtenida. Esta alteración en la composición de la fase móvil puede modificar los tiempos de retención de los analitos y, en casos críticos, superponer picos que en condiciones apropiadas serán separados.
La fase móvil luego de preparada, debe ser filtrada y desgasificada como se verá más adelante.

pH y pH aparente

El valor del pH de la fase móvil puede ser un parámetro crítico en la retención de solutos ionizables (sección 5.3) y en algunos casos, debe controlarse rigurosamente. Así, el pH de una solución acuosa aumenta cuando se incorpora un modificador orgánico[25,26]. Por otra parte, a valores de pH mayores a 7.5 se disuelve la sílice de base de las columnas, y a pHs menores a 2 se hidroliza la unión entre la sílice y la fase enlazada. Si bien se ha reportado[6] que el uso de columnas de saturación (precolumnas) minimizan el proceso de solubilización de la sílice a pHs elevados, su valor debe ser controlado.
Dado que el pH está definido para soluciones acuosas, debería medirse en las soluciones buffer antes del agregado del modificador orgánico. Cualquier medida que se realice con posterioridad, tendrá un significado diferente, pero no menos importante. Para estos casos se ha considerado una magnitud, llamada pH aparente (pH*) para diferenciarlo del pH medido en soluciones acuosas.
La medición del pH en soluciones no acuosas merece algunas consideraciones. La primera de ellas se refiere a las condiciones operativas. Los electrodos de referencia contienen una solución concentrada (3 o 4 M) o saturada de KCl. Esta solución se contacta con la solución en ensayo por un pequeño poro o un tapón cerámico permeable. Al sumergirse en un solvente orgánico el KCl puede precipitar, taponando la comunicación del electrolito con el medio. Para evitar este problema es recomendable el empleo de un electrodo de referencia de junta doble. Este electrodo tiene dos compartimientos, uno interior, con nivel constante de electrolito de referencia, y otro externo, que contiene una solución apropiada, que actúa como puente salino. De este modo se evita la contaminación de la referencia interna.
La segunda consideración, es puramente fisicoquímica. Podemos definir el pH, en términos termodinámicos, como:

$$\mathrm{pH} = -\log m_{\mathrm{H}}\ \gamma_{\mathrm{H}} \qquad (4\text{-}2)$$

Por su parte, el pH operacional (medido) es:

$$\mathrm{pH_x} = \mathrm{pH_b} + \frac{E_x - E_b}{0.0592} \qquad (4\text{-}3)$$

donde m_H es la concentración molal de protones, γ_H su coeficiente de actividad, pH_x el pH a medir, pH_b el pH del buffer de calibración, E_x la f.e.m. medida en la solución desconocida y E_b la f.e.m. medida con el buffer.
En las mezclas de agua con metanol, o con otro modificador orgánico, puede aplicarse la misma definición, y el pH termodinámico será:

$$\mathrm{pH}^* = -\log m_{\mathrm{H}}\gamma_{\mathrm{H}} \qquad (4\text{-}4)$$

donde el * es indicativo del medio hidroalcohólico.

Operativamente podría emplearse la ecuación (4-3) reemplazando pH_x por $pH_{(ap)x}$ y pH_b por $pH_{(*)b}$ para lo cual sería necesario tener un buffer para cada proporción agua/solvente orgánico. Es evidente que esto no resulta práctico, y la solución consiste en emplear un buffer acuoso para la calibración, efectuando las correcciones para cada caso en particular. Así:

$$pH_{(ap)b} = pH_b + \frac{E_x - E_b}{0.0592} \qquad (4\text{-}5)$$

donde: $pH_{(ap)x}$ es el pH medido en la solución agua solvente y pH_b es el pH del buffer acuoso. Como debe existir una corrección para las diferencias de potencial entre los medios acuoso y acuoso/orgánico:

$$pH_{(*)b} = pH_b + \frac{E_x - E_b}{0.0592} - \delta \qquad (4\text{-}6)$$

donde:

$$\delta = E_j - \log \gamma_H \qquad (4\text{-}7)$$

El factor de corrección δ representa la diferencia de potencial de junta líquida (E_j) y el efecto del medio (log δ).

El potencial de junta (E_j) es el potencial que aparece entre el electrolito que llena el electrodo de referencia y la solución muestra. Depende de la concentración y la velocidad de migración entre soluciones contiguas.

Relacionando (4-5) y (4-6) obtendremos δ parámetro correspondiente a la diferencia entre el pH termodinámico y el pH aparente, medido con el potenciómetro.

$$pH_{(ap)x} - pH_{(*)} = \delta \qquad (4\text{-}8)$$

El valor de δ para mezclas agua/metanol está descrito en la bibliografía[24,25] y nos permite el cálculo del pH termodinámicamente válido en sus mezclas (ver figura 4.2).

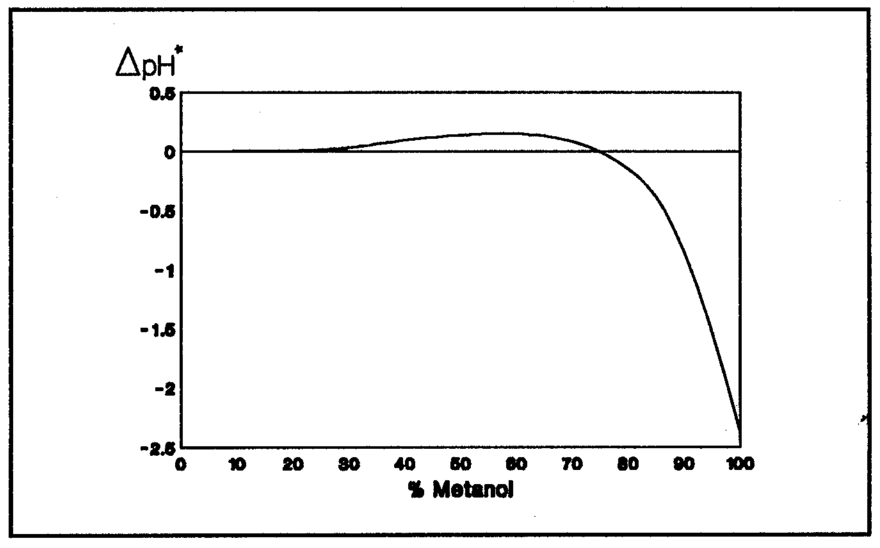


Fig. 4.2. Gráfico de valores de δ vs concentración de metanol en mezclas de metanol/agua.

Filtración

La filtración de las fases móviles se puede considerar como parte de un tratamiento preventivo para cuidar el adecuado funcionamiento del equipo de HPLC.

Las partículas presentes en la fase móvil pueden bloquear los filtros y tuberías del instrumento, acelerar el desgaste de sellos y rotores del inyector, afectar el normal movimiento de las válvulas de entrada y salida de las bombas, etc. Por otra parte, como el tamaño de las partículas que rellenan las columnas es muy pequeño, en general entre 3 y 10 µm, constituyen un filtro perfecto para la retención de todo material en suspensión que se introduzca con los fluídos, ya sea fase móvil o muestra en solución. El empleo de guardacolumnas, altamente recomendado, constituye un filtro final previo a la columna.

La filtración se efectúa por medio de membranas de 0.45 ó 0.22 µm de porosidad en equipos de filtración adecuados (véase figura 4.3) y es útil para eliminar tanto las partículas como las bacterias. La selección de la membrana, como se desprende de la tabla 4.IV, depende de su compatibilidad con los solventes.

De todas maneras es recomendable consultar los catálogos del fabricante a los efectos de verificar la compatibilidad membrana-solvente. Al filtrar una fase móvil se recomienda descartar los primeros mililitros del filtrado, que suelen arrastrar componentes de las membranas (plastificantes y antioxidantes).

Las soluciones a inyectar también deben filtrarse, idealmente a través de membranas semejantes a las empleadas para la fase móvil. Existen para ello dispositivos más pequeños, en los cuales se intercambia el filtro, y otros descartables, que incluyen el filtro.

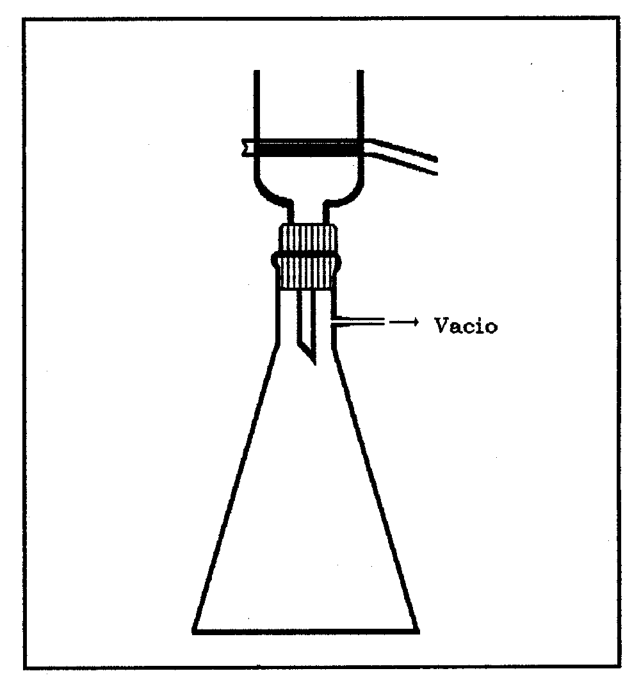


Fig. 4.3. Esquema de un equipo de filtración. El vaso superior está separado por una membrana filtrante de 0.22, 0.45 o 0,50 µm de porosidad y recibe el solvente a filtrar, que se recoje en el kitasato.

En el caso de la filtración de muestras, debe considerarse la posible contaminación debido a los componentes del filtro, y la posible pérdida de analito por adsorción tanto al filtro como a las paredes del soporte. Si la cantidad de muestra es muy pequeña, se puede reemplazar la filtración por la centrifugación en tubos adecuados.

Membrana	Tipo de solvente		
	Acuoso	**Ac/Org**	**Orgánico**
Celulosa regenerada			R
Ester de celulosa	R	NR	NR
Nitrato de celulosa	R	*	NR
Fluoruro de polivilideno	R	R	R
Nylon	R	R	R
Politetrafluor etileno (PTFE)	NR	NR	R
Teflon	NR	NR	R

R = recomendable NR = no recomendable
* = usar como máximo con 30 % de solvente orgánico

Tabla 4.IV. Compatibilidad de la membranas con los solventes (adaptado de los catálogos de Millipore, MFS y Gelman)

Desgasificación

Además de la filtración, la fase móvil debe desgasificarse. Los gases disueltos en la fase móvil pueden producir varios inconvenientes, entre ellos:

- ***Liberación de burbujas en el cabezal de la bomba.*** En este caso, el caudal es irregular, y se producen variaciones en la línea de base y en los tiempos de retención. Si la cantidad de aire es importante, la bomba comenzará a trabajar en vacío, pudiéndose dañar tanto los sellos como los pistones.
- ***Liberación o formación de burbujas en la celda del detector***, por descompresión de la fase móvil. En este caso, se producen oscilaciones en la línea de base y aparición de picos espurios. Para evitar este problema, a menudo se colocan restrictores a la salida del detector. Estos restrictores evitan la caída de presión e impiden la aparición de burbujas.
- ***El oxígeno disuelto*** puede presentar diversas dificultades dependiendo del sistema cromatográfico a utilizar[27-29]. Algunas de ellas son:
  - ***Pérdida de sensibilidad en los detectores de fluorescencia.*** Para que se produzca la emisión de fluorescencia, las moléculas de analito deben pasar del estado basal (S_0) a un estado excitado (primer y segundo estado de excitación, S_1 y S_2). Esto se hace normalmente por absorción de radiación UV. Así, la molécula llega al segundo estado S_2 y pasa rápidamente al menor nivel vibracional S_1 por desexcitación no radiactiva. Una vez que la molécula llega al estado S_1 puede volver al estado S_0 con la emisión de un fotón. Entonces, la fluorescencia es la emisión de un fotón por una molécula excitada que vuelve a su estado basal. Varios procesos de desexcitación no radiactiva pueden competir y reducir la emisión fluorescente. El "quenching" (extinción) es el más pronunciado. Quenching de fluorescencia es cualquier proceso que resulta en el decaimiento de la eficiencia fluorescente de una molécula, y ocurre por la transferencia de la energía absorbida por la molécula hacia otros canales distintos de la fluorescencia. El oxígeno molecular contribuye significativamente a este proceso, por colisión con las moléculas excitadas del analito. Este efecto varía con el tipo de compuesto siendo los hidrocarburos aromáticos, los aldehídos alifáticos y las cetonas muy susceptibles al oxígeno, mientras que los compuestos aromáticos sustituidos y heterociclos son mucho menos susceptibles[30]. Por ejemplo la relación entre la fluorescencia de una solución sin oxígeno con una solución saturada de aire, es para antraceno 1.2, pireno 9.0 y para benzopireno 2.9.
  - ***Alta corriente residual en detectores electroquímicos.*** En el caso del detector electroquímico, trabajando en forma reductiva, el oxígeno disuelto consume parte del potencial aplicado incrementando el ruido de la línea de base.
  - ***Oxidación de analitos.*** La presencia del oxígeno puede oxidar ciertos analitos[31] (por ejemplo ascorbato) durante la corrida cromatográfica.

- **_Aumento en la línea de base de los detectores UV._** La presencia de oxígeno en la fase móvil puede producir un aumento de la línea de base en los detectores UV. Este incremento en la absorción es más notorio a bajas longitudes de onda y, prácticamente deja de tener importancia a longitudes de onda mayores a 250 nm (ver tabla 4.V).

En la figura 4.4 se puede observar la variación de la línea de base del metanol controlada a 254 nm, comenzando con metanol saturado en oxígeno, que luego es desplazado por burbujeo de aire, helio y nitrógeno, produciéndose un salto de aproximadamente 0.41 AUFS.
Este incremento en la absorción depende del tipo de solvente, disminuyendo la susceptibilidad en el orden THF > MeOH > AcN. Se ha sugerido[30] que el oxígeno puede interactuar de dos modos diferentes con el solvente, ya sea por la absorción propia del oxígeno molecular, o por la formación de complejos inestables del oxígeno con el solvente, por ejemplo el metanol. En este caso el oxígeno puede eliminarse simplemente por desgasificación. En otros casos, pueden formarse compuestos químicamente estables, que no pueden removerse por desgasificación, por ejemplo la formación de peróxidos en THF.

Gas \ Longitud de onda	250 nm	230 nm	215 nm	210 nm
Aire	0.157	0.288	0.547	0.794
Helio	0.141	0.179	0.243	0.416
Nitrógeno	0.141	0.178	0.230	0.387
Dióxido de Carbono	0.141	0.229	0.352	0.448

Tabla 4.V. Absorbancia del metanol, a distintas longitudes de onda, saturado con los gases indicados.

Métodos de desgasificación

La cantidad de gas disuelto en un líquido depende de tres factores: Temperatura, Presión y Afinidad.
La **temperatura** puede favorecer o no la disolución del gas en el líquido. Si el proceso de disolución es exotérmico, el incremento de la temperatura disminuye la solubilidad, mientras que si es endotérmico, el incremento de la temperatura aumenta la solubilidad. Por ejemplo la solubilidad del nitrógeno en agua disminuye con el incremento de la temperatura pero aumenta en el benceno.
La solubilidad de un gas en un líquido es directamente proporcional a la presión parcial que ese gas ejerce sobre el líquido. Por ello, si por algún método efectivo, se reduce la

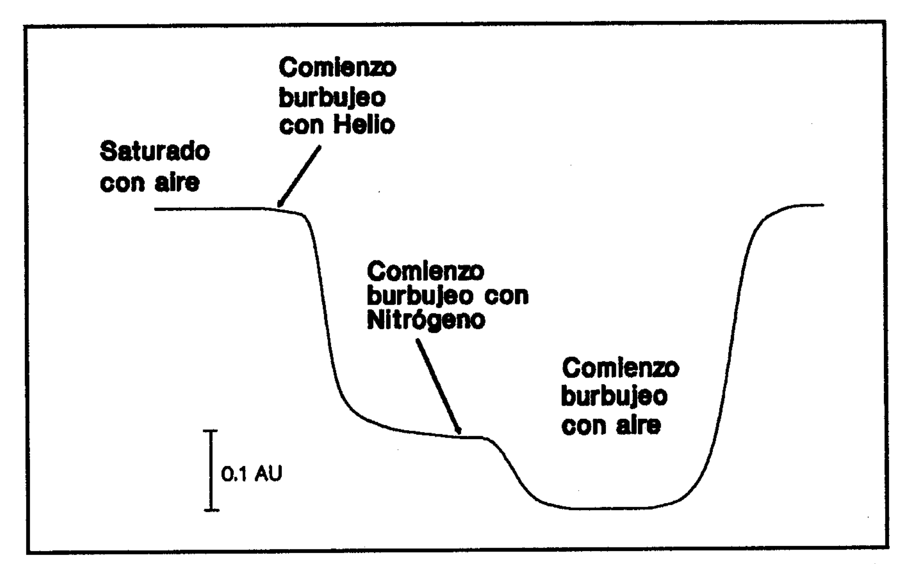


Fig. 4.4. Variación de la línea de base del metanol saturado con oxígeno por acción de desgasado (adaptado de referencia 32, con autorización del editor).

presión, la cantidad de gas en solución disminuirá.

Por último, la cantidad de gas disuelto depende de su **afinidad** mutua. Por ejemplo, si tanto en el gas como en el líquido las fuerzas predominantes son las de Van der Waals, la solubilidad será mayor que en aquellos líquidos en los que predomine otro tipo de fuerzas, por ejemplo puente hidrógeno, dipolo-dipolo, etc. Es por ello que gases como el oxígeno o nitrógeno, son más solubles en solventes como el hexano, que en el agua.

Todos estos conceptos nos sirven como base para comprender los métodos que habitualmente se emplean para la desgasificación de las fases móviles, a saber:

- ***Reflujo.*** Consiste en el calentamiento o la ebullición a reflujo de la fase móvil con la ayuda de agitación durante unos 15 minutos. Por este procedimiento se eliminan prácticamente todos los gases disueltos. Habitualmente no se emplea, ya que se debe aplicar en forma continua para prevenir la redisolución de los gases atmosféricos y a que no puede emplearse en el caso de mezcla de solventes.

- ***Burbujeo de un gas inerte.*** Se puede realizar en forma continua o por cortos períodos de tiempo. Se realiza a través de una pieza de acero inoxidable sinterizado ("buzo") con diámetro de poro de 2 a 10 μm, y a un caudal de unos 80-100 ml/min. De esta forma, se logra un efectivo desplazamiento de los gases. Alcanzado el equilibrio, se reduce el caudal para impedir el reingreso de gases atmosféricos.

  Con el fin de reducir costos, ya que el helio es un gas bastante caro, es conveniente el uso de reservorios de solventes provistos de tapas con válvulas que permitan mantener una cierta presión sobre la fase móvil para evitar la redisolución de los gases

y que permitan trabajar a un caudal constante de unos 50 ml/min. Se debe trabajar con buena ventilación ya que este burbujeo puede desplazar al ambiente al componente más volátil de la fase móvil.

- *Ultrasonido.* El ultrasonido es una onda electromagnética, producida por la propagación de un choque mecánico generado por un cristal piezoeléctrico. Esa onda necesita un soporte material, no se propaga en el vacío y se caracteriza por la frecuencia. En los baños ultrasónicos de uso en laboratorio se emplean equipos en el rango entre 20 y 50 KHz. La onda generada se propaga a más de 20000 ciclos por segundo y viaja a través del líquido como ondas alternas de compresión-descompresión, dando lugar a la formación e implosión de microburbujas, fenómeno que se conoce como "cavitación".

  La aplicación inmediata de esta propiedad es la limpieza de materiales, especialmente los que presentan zonas de difícil acceso, o para la disolución de sólidos. Del mismo modo, aplicado a la desgasificación de un líquido, no reduce la solubilidad de un gas disuelto, y no puede expulsarlo sino cuando la solución está sobresaturada. Es así que su aplicación para la desgasificación da los resultados más pobres , y en ocasiones puede aumentar el nivel de oxígeno disuelto[32].

- *Vacío.* Es el método más frecuentemente empleado. En general se aplica junto al proceso de filtración (ver equipo en la figura 4.3).

  Si se prepara fase móvil para más de un día de trabajo, debe filtrarse y desgasificarse a diario, como si se tratara de una solución recientemente preparada.

  Como medida de seguridad, durante la preparación de la fase móvil se debe emplear protección ocular y buena ventilación. En el caso de que la desgasificación se efectúe con una bomba de vacío, ésta debe ser a prueba de explosiones, ya que durante el uso, puede aspirar solventes volátiles de la fase móvil. La figura 4.5 muestra curvas de efectividad de los métodos descritos aplicados a hexano y metanol.

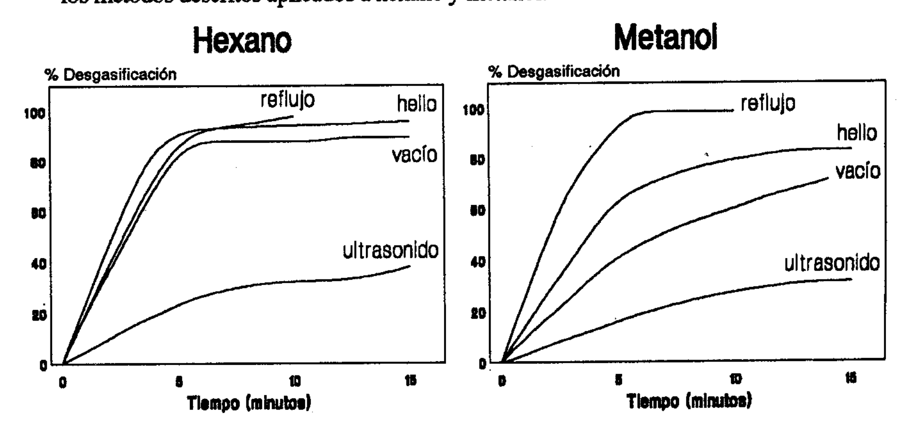


Fig. 4.5. Métodos de desgasificación aplicados a hexano y metanol (de referencia 30 con autorización del editor).

REFERENCIAS

1. Horváth Cs., Melander W., J. Chromatogr. 125, 129, (1976)
2. Horváth Cs., Melander W., Molnar I., Anal. Chem. 49, 142, (1977).
3. Waters Assoc Publicación # 35669 1ed May 1989
4. Snyder L.R., J.J.Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2da. edición, Wiley Int. Publication, 1979.
5. Snyder L., J of Chrom 92, 223, (1974)
6. Rabel F.M., J of Chrom Sci 18, 394, (1980)
7. Sampson E.J. y Culbreth P.H., Clin Chem 27, 1773, (1981)
8. Sampson E.J. y Culbreth P.H., Clin Chem 28, 1393, (1982)
9. Bristol D.W., J of Chrom 188, 193, (1980)
10. Jackson M.T., J of Chrom Sci 25, 282, (1977)
11. Gurkin M. y Ripphahn J., American Laboratory May, 99, 1980
12. Carlsen L.,Egsgaard H. y Andersen R.J., Anal Chem 51, 1593, (1979)
13. "Reagent chemicals, American Chemical Society, Specifications", 5ta. edición, Washington DC (1974)
14. "Purification of solvents by adsorbents Woelm", Bulletin # A1 19 Woelm Pharma GmbH and Company D-3440 Eschwege Alemania
15. Smukler H.W., J of Chrom Sci 8, 581, (1970)
16. Brown P.R. "HPLC Biochemical and Biomedical Applications", Academic Press New York, New York 1973
17. Dolan J.W. y Berry V.V., LC 1, 542, (1983)
18. Bardford R.A. y Sliwinski B.J., J of Chrom 171, 335, (1979)
19. Riddick J.A. y Bunger W.B. "Organic Solvents", 3ra edición, Wiley-Interscience New York, New York (1973)
20. Bredweg R.A.,Rothman L.D. y Pfeiffer C.D., Anal Chem 51, 2061, (1979)
21. Ku A.Y. y D.H.Freeman, Anal Chem 49 (1977) 1637
22. Gerbacia W.E.F., J of Chrom 166, 261, (1978)
23. Glajch J.L.,Kirkland J.J. y Schindel W.G., Anal Chem 54, 1276, (1982)
24. Hesse G, Schildkneck H., Angew Chem 67, 737, (1955)
25. Rorabacher D.B. y colaboradores, Anal Chem 43, 561, (1971)
26. Van De Venne J.L.M. y Hendrikx L.H.M., J of Chrom 167, 1, (1978)
27. Mac Crehan W.A. y Nay We, Anal Chem 56, 625, (1984)
28. Wightman R.M. y colaboradores, Anal Chem 50, 1410, (1978)
29. Senftleber F. y colaboradores, Anal Chem 55, 810, (1983)
30. Bakalyar S.R.,Bradley M.P.T. y Honganen R., J of Chrom 204, 115, (1981)
31. S.A. Margolis y I.B. Black J Assoc of Anal Chem 20, 806, (1987)
32. Brown J.N.; Hewins M.; Van Der Linden J.H.M.; Lynch R.J., J of Chromatogr 204, 115, (1981)

Capítulo 5

Cromatografía de Fase Ligada

5.1 Introducción

Hasta hace aproximadamente dos décadas, la cromatografía líquida en columna se efectuaba en tubos abiertos y se reducía básicamente a cuatro métodos:

- Cromatografía de adsorción o líquido-sólido (LSC, liquid-solid chromatography), en la cual se empleaba una fase estacionaria, generalmente de silicagel o alúmina, de naturaleza polar y una fase móvil no polar.
- Cromatografía de partición o líquido-líquido (LLC, liquid-liquid chromatography), en la cual el analito se distribuía entre la fase estacionaria líquida inmiscible en la fase móvil y fijada mecánicamente a un soporte inerte (tierra de diatomeas, silicagel irregular, de poros grandes y baja actividad, etc).
- Cromatografía de intercambio iónico, en resinas con grupos funcionales aniónicos (sulfónicos, carboxílicos) o catiónicos (amonios cuaternarios).
- Cromatografía de filtración molecular, en geles (polímeros entrecruzados de agarosa o dextranos: Sepharosa, Sephadex).

La cromatografía de partición (LLC) fue de tal importancia que sus creadores, Martin y Synge, recibieron en 1952 el premio Nobel de Química. Sin embargo, la LLC no estaba libre de desventajas, provocadas especialmente por la débil unión de la fase estacionaria al soporte. Para evitar la pérdida de la fase estacionaria (sangrado o bleeding), la fase móvil debía estar saturada en fase estacionaria, la muestra debía disolverse en esta fase móvil saturada y no podían efectuarse gradientes de elución, ni emplearse la temperatura como variable de separación.

Este problema llevó al estudio de materiales alternativos, donde la fase estacionaria estuviera químicamente unida a la fase móvil. El primer trabajo efectuado en cromatografía de fase ligada se debe a Howard y Martin[1], que en 1950 trataron tierra de diatomeas con dimetilclorosilano en fase vapor, obteniendo un material hidrofóbico estable. En realidad, emplearon este material en modalidad LLC, como soporte de octano, la fase estacionaria verdadera, y usaron como fase móvil mezclas hidro-metanólicas. Como la polaridad de las fases se invertía, este proceso fue llamado **cromatografía de partición en fase reversa**. Esta técnica tuvo gran difusión y a mediados de la década del '60, la silanización fue "exportada" a la cromatografía gaseosa. Sin embargo, el mayor impacto de la fase ligada en cromatografía líquida se produjo recién en 1970, cuando Kirkland y De Stefano[2], combinaron el método descrito por Abel[3] para silanización y el material pelicular de Horváth[4], para crear el primer relleno de fase reversa, que llamaron Permanase ODS. Este tipo de partícula, que aún se comercializa, está formada por una fina capa de fase estacionaria (relación aproximadamente 1/40 respecto al diámetro total) recubriendo un core de vidrio. El diámetro de la partícula es de 35 a 60 µm y es fácil de empacar en la columna, que resulta muy permeable (de baja resistencia al caudal). Sin embargo, a partir de 1972, fue desplazada por el material microparticular descrito por Majors[5] por dos razones fundamentales: su baja eficiencia y capacidad de carga. De todos

modos, algunos analistas siguen empleando este material para la preparación de guarda-columnas.

El notable aumento de calidad del material de relleno y el avance en la instrumentación, llevaron al nacimiento y rápido crecimiento de una nueva modalidad: la HPLC o cromatografía líquida de alta performance, en la cual los principales logros se concentraron en tres parámetros fundamentales: **resolución, reproducibilidad y rapidez.**

Actualmente, el método dominante es la cromatografía de fase ligada (BPC, bonded phase chromatography) que puede clasificarse en **fase normal** (NP-BPC) y **fase reversa** (RP-BPC, RPLC -reversed phase liquid chromatography- o simplemente RP), de acuerdo a la polaridad relativa de la fase móvil y de los grupos funcionales químicamente ligados a la matriz. Cerca del 80 % de las separaciones cromatográficas se efectúan con material de fase ligada y más del 70 % corresponde a cromatografía en fase reversa.

En BPC, la partícula base de silicagel se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos, los silanoles, de características polares, por determinados grupos funcionales: octadecilsilano (frecuentemente llamado ODS o C18), octilsilano (C8), fenilo, ciano (CN), amino, diol, etc.

En algunos casos, la misma fase ligada puede ser empleada en fase normal o reversa según el tipo de fase móvil usada. Por ejemplo, un relleno ligado a grupos ciano funcionará en fase normal si la fase móvil es hidrófoba (por ejemplo isooctano) o en fase reversa, cuando se emplean mezclas hidroalcohólicas.

En RPLC, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil polar. Este cambio de la polaridad de fases resulta, naturalmente, en un cambio en el orden de elución de los componentes de las muestras en estudio. Las variaciones, resumidas en la tabla 5.I, son tan directas y profundas, que llevaron identificar el método con nombre propio: si lo que se había hecho hasta ese momento (varias décadas) se consideraba "normal" (NPLC, normal phase liquid chromatography) esta nueva forma de cromatografía, en la que se invertía la polaridad de las fases y el orden de elución de los analitos, bien podría denominarse "fase reversa" o RPLC.

Hoy, los papeles se han invertido en lo que respecta a la técnica de mayor empleo y difusión, al punto que Melander y Horváth[10] dicen (probablemente como ironía), que para hacer justicia al método, debería cambiarse el nombre de la LSC para llamarla, ya no de fase "normal", sino de "fase reversa revertida".

La cromatografía en fase reversa ha desplazado no sólo a la cromatografía en fase normal (aunque nunca podrá hacerlo totalmente), sino que también ocupa terrenos hasta hace poco exclusivos de la cromatografía de intercambio iónico y su empleo es progresivo para el análisis de macromoléculas, antiguamente tratadas sólo por técnicas de filtración molecular, intercambio iónico y electroforesis.

FASE	NORMAL	REVERSA
Polaridad del relleno	ALTA	BAJA
Polaridad del solvente	BAJA	ALTA
Orden de Elución	primero el menos polar	primero el más polar
Efecto del incremento de polaridad del solvente	Reduce los tiempos de retención	Aumenta los tiempos de retención

Tabla 5.I. Características de la cromatografía en fase normal y fase reversa.

5.2 El Material de Relleno

El material de relleno de una columna de BPC está constituido por partículas, definidas por una serie de características:

- morfología
- tamaño
- porosidad
- estructura química

Morfología

El material empleado puede adoptar básicamente dos formas, irregular o esférica, y un tamaño comprendido entre los 2 y 60 µm de diámetro, o mayor en cromatografía preparativa, con un **estrecho rango de distribución de tamaño.**
Las columnas analíticas modernas se rellenan con partículas de entre 3 y 10 µm de diámetro. Si bien hasta hace pocos años se hablaba de una columna "convencional" de 25-30 cm de longitud y 4 cm de diámetro interno, rellena con partículas de 10 µm, irregulares o esféricas, actualmente se tiende a emplear columnas de 25 cm o de 10-15 cm de longitud con partículas de 5 µm, según la resolución requerida, y columnas de 3-6 cm de longitud con partículas de 3 µm en la denominada High Speed o Fast LC.
Las estadísticas indican incluso una tendencia a emplear partículas esféricas, no por razones de resolución (si bien es probable que la partícula esférica pueda empaquetarse mejor, resultando indirectamente en una columna más eficiente), sino simplemente de "resistencia mecánica de la partícula", menos sensible al desgaste, y a la mayor "permeabilidad" de la columna al paso de la fase móvil, resultando en menores presiones y con ello a un menor "sufrimiento" del equipo. En cromatografía preparativa, en cambio,



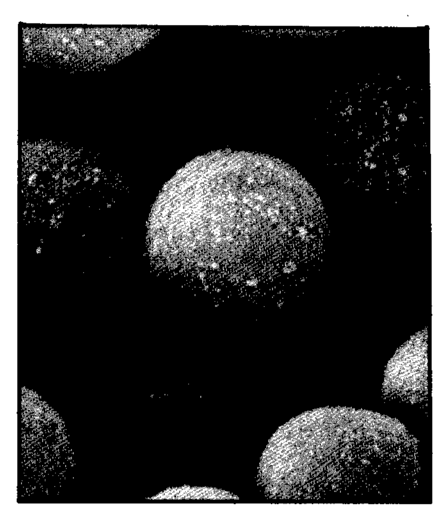


Fig. 5.1. Microfotografía electrónica de dos tipos de material de relleno para HPLC, LiChrosorb, irregular (izquierda) y LiChrospher, esférico (derecha). Cortesía de E. Merck.

se emplean partículas mayores, de 10 a 200 µm de diámetro, que ofrecen mejor balance resolución-permeabilidad.

También es posible preparar partículas de menor diámetro. Así, Unger[12] preparó microesferas de sílica totalmente no porosa de 1 µm de diámetro y Danielson[13] micropartículas de fase reversa totalmente porosas de 2 µm de diámetro, de poro ancho (200 Å). Estas últimas permitieron al autor fabricar columnas de 3.3 cm de longitud, con 130,000 platos teóricos por metro, muy rápidas (ver figura 5.2, con la separación de 5 proteínas en unos 50 segundos). Lamentablemente, este tipo de partículas no ha sido aún comercializado.

Porosidad

La porosidad de la partícula es la relación entre el volumen interno de los poros y el volumen de la partícula.

Los poros son cavidades, de mayor profundidad que diámetro y de tamaño y morfología muy variada. Pueden ser "abiertos", cuando están comunicados con la superficie de la partícula, o cerrados, cuando no lo están.

Básicamente, se habla de microporos cuando su diámetro es menor que 20 Å, mesoporos cuando su diámetro está comprendido entre 20 y 500 Å y macroporos cuando es mayor que 500 Å.

La porosidad es responsable de los fenómenos de exclusión y de la velocidad de

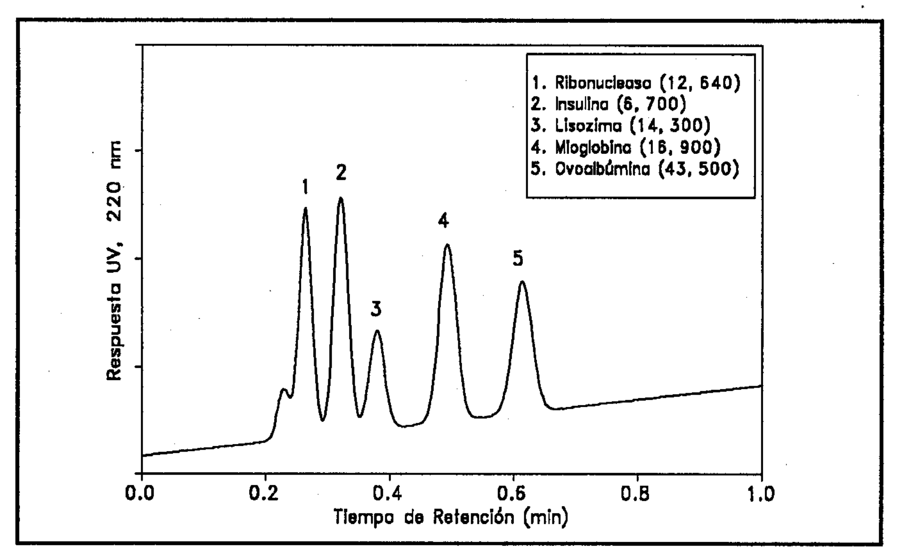


Fig. 5.2. Separación de proteínas con partículas de 2 μm, de poro ancho (200 Å). Gradiente de AcN-H_2O (25:75) a AcN, con TFA 0.1 %, en 0,3 min a 3.3 ml/min (referencia 13, publicado con permiso del Editor).

transferencia de masa de soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria (término "C" de la ecuación de Van Deemter : H = A.u + B/u + C.u. Para mayor información, véase capítulo 3).

El ***área superficial***, parámetro que determina la capacidad de retención de la fase estacionaria, está compuesta por el área externa (superficial) de la partícula, con sus depresiones y prominencias y por el área de las paredes internas de los poros.

Si calculamos el área externa (Unger[6]) como:

$$a_{s(ext)} = \frac{6}{\rho \; dp} \tag{5-1}$$

donde (ρ) es la densidad del sólido (aproximadamente 2 g/ml) y dp el diámetro de la partícula, veremos que una partícula de 10 μm tendrá un área superficial de 0.3 m^2/g. Si tenemos en cuenta que el área superficial de las partículas modernas está comprendida, según el tipo de material, entre 30 y 550 m^2/g, es claro que, en general, mucho menos del 1 % del área superficial está localizada en la superficie de la partícula y **sólo las moléculas que penetran en los poros participarán de los procesos separativos.** En otras palabras, el **diámetro** del poro determina por un lado el área superficial y por otro, los fenómenos estéricos de exclusión. En general (ver tabla 5.II), a menor diámetro de poro corresponde mayor área superficial y consecuentemente, mayor retención.

Material	dp (μm)	a_s (m^2/g)	pd (Å)
LiChrosorb Si 60	5-7-10	500	60
LiChrosorb Si 100	5-7-10	300	100
LiChrospher Si 100	5-7-20	250	100
LiChrospher Si 300	10	250	300
LiChrospher Si 500	10	60	500
LiChrospher Si 1000	10	30	1000
LiChrospher Si 4000	10	10	4000

Tabla 5.II. Relación entre diámetro de poro y área superficial en partículas de silicagel. Los términos dp, a_S y pd corresponden a diámetro de partícula, área superficial y diámetro de poro respectivamente (Cortesía de E. Merck).

Este efecto se observa claramente en la figura 5.3, que ilustra la separación de una mezcla de compuestos de bajo peso molecular, con materiales de la tabla 5.II.
Según Hearn y Grego[7], la retención en fase reversa depende de mecanismos de exclusión, efectos solvofóbicos y polaridad. Los mismos autores estiman que el analito tendrá completo acceso a la superficie interna del poro si el tamaño de la molécula es menor o igual a 1/10 veces el diámetro del poro. Por ejemplo, una molécula de 6 Å tendrá completo acceso a un poro de 60 Å. Una molécula pequeña (alrededor de 500 daltons) se retiene menos en un material de poro pequeño (75 Å) que en material de poro mediano (100 Å) y este fenómeno se debe que, por efectos estéricos, existe un acceso restringido al interior del poro.
Cuando el poro es menor de 60 Å, los efectos de exclusión son tan notorios aún para moléculas pequeñas que la columna es menos eficiente que una similar, con partículas de igual diámetro pero de mayor tamaño de poro[8].
Las moléculas de peso molecular mayor que 2000 (las macromoléculas en general), se separan mejor cuando el diámetro de poro es de 300 Å o mayor. Sin embargo, las partículas de diámetro de poro mayor que 500 Å, aún a caudales moderados, son sensibles a la erosión mecánica y tienen menor vida media[9].

Estructura química

Debe hacerse una diferenciación entre la estructura interna de la partícula y la estructura química superficial, ya que es esta última la responsable de los procesos de retención. Para que durante el proceso cromatográfico se produzca una diferenciación entre las moléculas de analito y las de la fase móvil, la superficie del adsorbente debe funcionar como un receptor de las moléculas de analito.
La estructura química superficial es diferente de la interna y está constituida por grupos funcionales activos, naturales o producto de una modificación inducida y permanente.

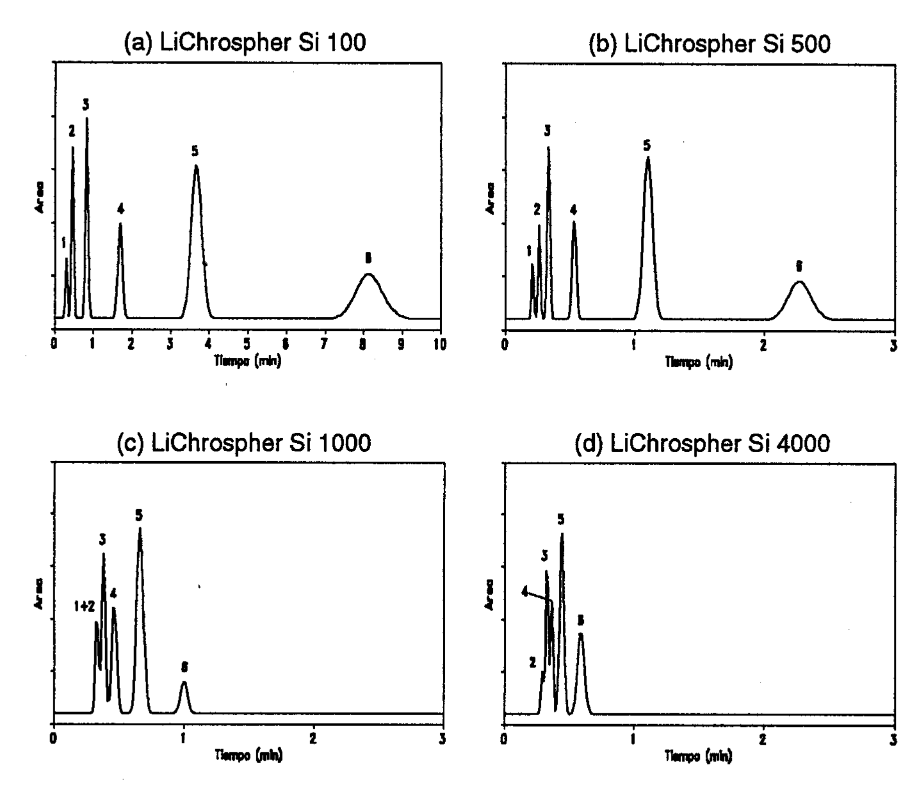


Fig. 5.3. Separación en fase normal, empleando n-heptano con humedad relativa de 20 % como fase móvil y columnas de 20 cm de longitud y 3 mm de diámetro interno, rellenas con material de 10 µm de diferente diámetro de poro: 100, 500, 1000 y 4000 Å. Los componentes indicados corresponden a: (1) benceno, (2) difenilo, (3) m-terfenilo, (4) m-tetrafenilo, (5) m-pentafenilo y (6) m-hexafenilo. (Cortesía de E. Merck).

Dado que la silicagel es, al menos hasta hoy, el material de base más empleado en RPLC, nos referiremos a ella en primer lugar y recién en segundo término a las modificaciones químicas que la convierten en material de fase reversa.

Características de la Silicagel

La silicagel empleada para cromatografía de adsorción es un sólido amorfo y poroso, de gran área superficial (30 a más de 500 m^2/g), alto volumen de poro (0.4 - 1.2 ml/g) y un diámetro de poro uniforme y comprendido entre 60 y 300 Å, aunque pueden emplearse mayores diámetros de poro en otras metodologías, típicamente, cromatografía de exclusión molecular.

Químicamente, puede definirse como un óxido de silicio hidratado, de tipo $(SiO_2.H_2O)_n$,

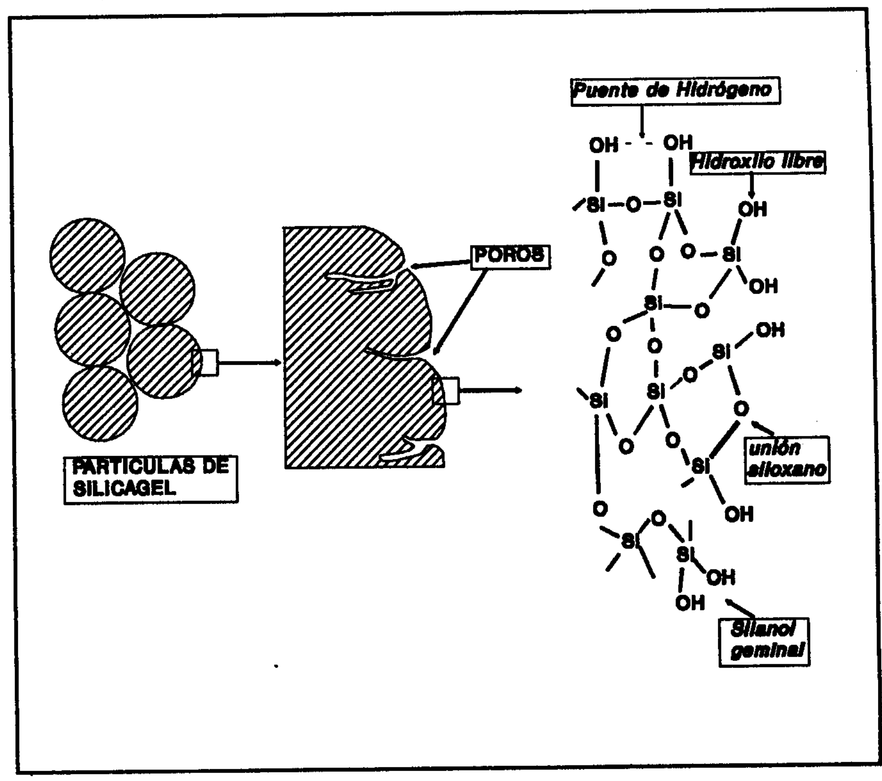


Fig. 5.4. Estructura de la silicagel, mostrando sus poros y la estructura química interna y externa.

en el cual sus átomos metálicos internos están ligados entre sí por átomos de oxígeno (puentes siloxano Si-O-Si) y los superficiales a grupos hidroxilo, constituyendo los grupos silanoles (Si-OH). Estos silanoles pueden ser de tipo "libre", "vecinal" o "geminal" y son los responsables de la actividad superficial.

La silicagel es fuertemente higroscópica y el agua fijada por puentes de hidrógeno a los silanoles es responsable de su bloqueo y pérdida de actividad. El agua adsorbida es desorbida por tratamiento térmico a 125-175°C, pero a temperaturas superiores a los 200°C se pierde agua por condensación de los grupos silanoles con formación de puentes siloxanos estables, produciéndose una sílica hidrófoba e inactiva.

La concentración de hidroxilos superficiales en una silicagel totalmente hidroxilada corresponde a 5 $HO^-/Å^2$, los que en partículas de 450 m^2/g equivalen[6,9] a unos 8-9 μmoles/m^2 .

La silicagel es insoluble en solventes no polares, como los empleados en fase normal, pero es soluble en agua, hasta 100 ppm a temperatura ambiente y pH neutro y aumenta mucho a valores de pH mayores que 7.5. La solubilidad en medio alcalino será incluso mayor si

la fase móvil contiene compuestos que forman complejos con los silicatos disueltos, por ejemplo, los compuestos de tetraalquilamonio empleados habitualmente en cromatografía de apareamiento iónico (IPC, ver más adelante).
El limitado rango de estabilidad a la disolución de la silicagel en función del pH ha llevado al desarrollo de otros soportes, de base polimérica, como alternativa. Actualmente, la silicagel sigue siendo el material de base de mayor empleo, pero los rellenos de base polimérica, que permiten trabajar en amplios rangos de pH (1 a 13) tienen una difusión creciente.

Preparación de la fase ligada

La partícula de fase ligada está compuesta por un material de base, silicagel, alúmina, agarosa, copolímero de estireno y divinilbenceno, etc, al que se une químicamente un compuesto que contiene un grupo funcional determinado. La estructura química interna y superficial, su reactividad y pureza, le confieren características muy variadas y determinan profundas diferencias en el tipo de tratamiento. La mayor parte del material disponible comercialmente está formado por silicagel a la cual se ha unido un grupo funcional por unión covalente de tipo siloxano (Partícula-Si-O-R).
Las uniones del grupo funcional a la silicagel son básicamente cuatro:

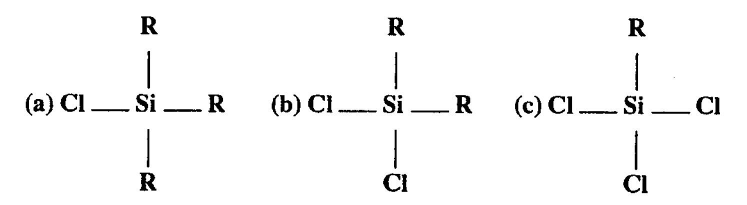
1. **Tipo éster** (Si-OR)[14].
   Este tipo de unión se forma entre los silanoles y un alcohol y fue empleada en GC, pero el intento de transferirlo a LC fracasó por la baja estabilidad a la hidrólisis de la unión éster.
   Partícula-SiOH + R-OH → Partícula-Si-OR + H_2O

2. **Tipo amino** (Si-NR_2)[15,16].
   Preparada por reacción de la silicagel con cloruro de tionilo y el producto de ésta reacción con una amina. Esta fase estacionaria es más estable que la de tipo éster, pero sólo en el rango de pH comprendido entre 5 y 7. Probablemente por este motivo no se elabora con fines comerciales.
   Partícula-SiOH + $SOCl_2$ → Partícula-Si-Cl
   Partícula-Si-Cl + HNR_2 → Partícula-Si-NR_2 + H_2O

3. **Tipo Carbono** (Si-CR3)[17].
   Este tipo de BP, que tampoco tuvo difusión en LC, se prepara en dos etapas: una halogenación de la sílica con cloruro de tionilo similar a la que se efectúa para el tipo amino, seguida por una reacción con un reactivo de Grignard, en la referencia, bromuro de naftil, bencil o alquil magnesio.

4. **Tipo Siloxano** (Si-O-SiR3)[18,19].
   Es la de mayor difusión (prácticamente total en rellenos de base sílica). Se sintetiza por reacción de los silanoles de la sílica con organo-n-halo-silanos (generalmente clorosilanos), que pueden ser (a) monofuncionales, (b) bifuncionales y (c) trifuncio-

nales. Por ejemplo, para un clorosilano:



La mayor reactividad corresponde al triclorosilano y la menor al monoclorosilano. La reacción puede efectuarse en medio anhidro, resultando en la formación de una monocapa, o en presencia de agua, lo que dará lugar a la formación de capas poliméricas con di- y tri-clorosilanos. Como se verá, los monoclorosilanos no pueden formar capas múltiples, sólo forman monocapas.
El agua puede ser agregada intencionalmente para obtener la capa polimérica, o accidentalmente por humedad ambiental, solventes mal secados o humedad residual en los recipientes. Incluso, un clorosilano mal almacenado puede estar ya polimerizado dentro de su envase por la humedad ambiental, debido a reiteradas aperturas, o bien por un cierre defectuoso.
Durante la silanización, la polimerización puede ser lineal o entrecruzada y el proceso es difícil de controlar. Así, algunas partículas pueden contener capas poliméricas de mayor espesor que otras. Esto resulta en diferencias en parámetros de importancia cromatográfica como velocidad de transferencia de masa del soluto y capacidad de carga de la columna. Inclusive, difícilmente se consigan lotes de calidad reproducible.
Por estos factores, el tipo de capa de mayor difusión es la monomérica. La reacción es (véase figura 5.5) un ataque nucleofílico del oxígeno del hidroxilo de la sílica al átomo de silicio del silano. Este ataque se favorece por agregado de una base (piridina, imidazol), que sirve para tomar el HCl liberado y como catalizador por formación de un intermediario previo al siloxano[20].
Como ya se ha visto, la sílica completamente hidroxilada contiene 8-9 μmoles HO^-/m^2. Sin embargo, la máxima cobertura lograda para una capa monomérica con trimetilclorosilano (TMCS), una molécula pequeña, es de 4.5 a 4.9 μmoles/m^2, es decir, suficiente para reaccionar con aproximadamente el 50 % de los silanoles superficiales y sólo se logra un 4.1 μmoles/m^2 con n-alquil dimetil silanos, donde el n-alquilo es algo mayor que el metilo del TMCS[6]. Esto se debe a factores estéricos. Las moléculas de reactivo silanizante grandes (por ejemplo octadecil dimetil clorosilano) simplemente no pueden llegar a la base de los poros, especialmente si la entrada de los mismos fue objeto de reacción previa por otras moléculas silanizantes.
En una separación en fase reversa, los silanoles superficiales que no llegaron a silanizarse, pueden dar lugar a mecanismos mixtos de retención, fuerte retención de solutos polares, picos asimétricos con solutos básicos (por su naturaleza acídica), adsorciones indeseadas e incluso disminuir la vida media de la columna, por ofrecer un blanco al ataque por agua

a la silicagel subyacente a la fase ligada.
Para eliminar o reducir el efecto de los silanoles superficiales, muchas veces se completa la silanización con moléculas grandes (que dan origen a rellenos de C18 y de C8) con una segunda silanización, pero con una molécula más chica, por ejemplo, TMCS o hexametildisilazano. Este proceso, conocido como "end-capping" o "capping-off", puede completar la cobertura de la matriz, pero como se ha visto y como puede demostrarse por técnicas de intercambio isotópico, quedan aún grupos sin reaccionar. De cualquier modo, es poco probable que los solutos que habitualmente se manejan en RPLC puedan penetrar hasta zonas en las cuales no lo ha hecho el TMCS.
Para comprobar si un material fue sometido al proceso de end-capping, puede controlarse la retención de un soluto medianamente polar, como acetofenona, empleando una fase móvil no polar, por ejemplo hexano seco. En materiales con end-capping, el k' será muy bajo (menor a 1), pero en materiales sin tratamiento será muy grande (mayor a 10)[28].

Silanización de la Silicagel

Como la silanización se efectúa sobre los grupos silanoles libres accesibles, se trata de maximizar su concentración superficial. Esto se logra calentando el material con ácidos (clorhídrico o nítrico y sulfúrico[21]) o por calcinación a 850°C para aumentar su resistencia mecánica, seguida de un tratamiento con ácido fluorhídrico para producir nuevamente los silanoles superficiales[22].
Luego, la silicagel se suspende en un solvente, generalmente tolueno y se calienta a reflujo con el clorosilano (por ejemplo octil dimetil clorosilano) y una amina (piridina, imidazol) para tomar el HCl liberado y catalizar la silanización. La carga carbonada aumentará proporcionalmente con la temperatura y tiempo de reflujo, hasta llegar a un plateau. Luego de la silanización primaria, puede efectuarse una segunda silanización con trimetilclorosilano (end-capping). Finalmente, el producto se lava con tolueno, metanol, acetona, y se seca. Procedimientos más detallados acerca de la síntesis y caracterización de materiales de fase reversa y referencias complementarias pueden encontrarse en los trabajos de Unger[6] y escapan al alcance de este libro.
Como puede verse, cualquier persona puede fabricar un relleno de fase reversa. Sin embargo, como señalara Karch[23], lo difícil es **"cocinar"** una buena fase reversa. Esto es así debido a la calidad de los materiales actuales, para los cuales son precisos rigurosos controles de proceso.
La elección que el analista debe hacer entre los tipos de fase ligada (una muestra de la variedad se muestra en la tabla 5.III), depende del tipo de muestra. En general, a mayor carga carbonada o a mayor lipofilicidad del sustituyente, corresponde mayor retención. Sin embargo, la selección entre columnas de similar selectividad, por ejemplo C18 y C8, no siempre es tan simple, debido a la suma de factores responsables la retención.
Debe notarse que, así como existe una relación entre la polaridad de la fase ligada y la retención, ejemplificada en la figura 5.6, existe una diferencia de selectividad, producto de la diferencia en el tipo o mecanismo de interacción entre la fase ligada y el soluto.

Fig. 5.5. Algunas de las rutas de síntesis de la fase ligada a silicagel, mostrando la unión de un organo-monoclorosilano a un silanol libre (a), y de un organo-diclorosilano a un silanol libre (b) y a un silanol geminal (c).

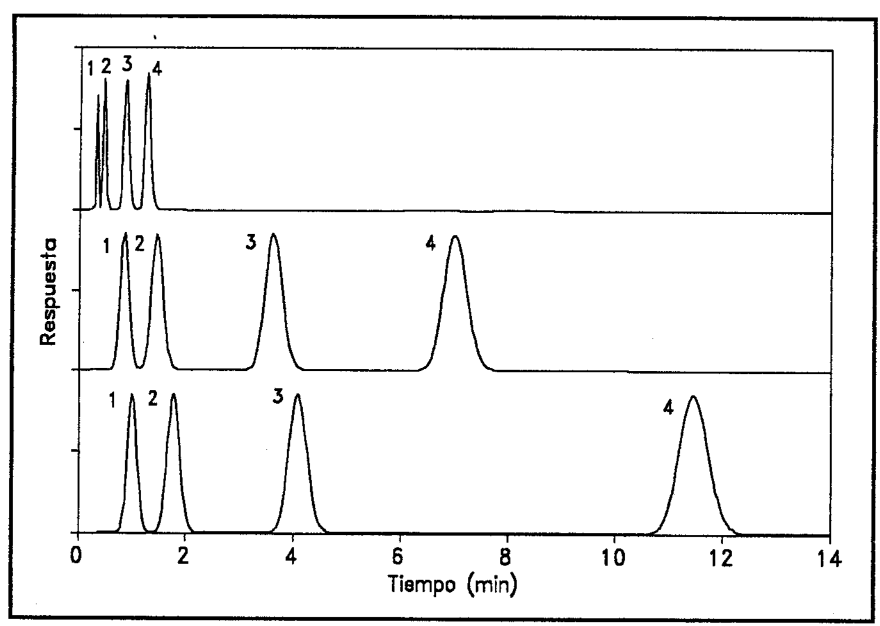


Fig. 5.6. Retención en una columna Bondapak CN (superior), Bondapak Fenil (medio) y Bondapak C18 (inferior) para una mezcla de (1) Fenilefrina, (2) Fenilpropanolamina, (3) Nafazolina (4) Clorfeniramina (adaptado de 24).

Esta diferencia de selectividad puede reflejarse como una diferencia en la isoterma de sorción del soluto en la fase estacionaria, es decir, como una diferencia en el grado de adsorción que puede resultar en un cambio del orden de elución de los componentes de una mezcla.

A esta diferencia de selectividad debida al grupo funcional ligado se agregan además las que pudieran deberse a la preparación del material de relleno en sí mismo, en especial, la cantidad de grupos silanoles residuales, end-capping, grado de cobertura o diferencias de porosidad del material (diámetro de poro, volumen, tipo). Como resultado, es frecuente encontrarse con diferencias no solo en el grado de retención sino también en la selectividad de columnas del mismo tipo y diferente fabricante[25-27].

Evidentemente, un cambio de "marca de columna" no debería ser tomado a la ligera, con la única guía de la funcionalidad de la fase ligada y ante la necesidad de un cambio en el origen de la columna en un método probado, **el método debe ser revalidado** (capítulo 12).

Así por ejemplo, la figura 5.7 muestra algunas de las observaciones de Goldberg[25], que probó una extensa serie de columnas con solutos de características disímiles: un soluto hidrofóbico (antraceno), uno medianamente polar (ftalato de dietilo), uno de características básicas (cafeína) y uno de tipo acídico (ácido toluoico).

k' Antraceno

0 1 2 3 4 5

Ultrasphere ODS
Zorbax ODS
Ultrasphere IP
Micropak MCH 5 ODS
Micropak MCH 10 ODS
Partisil ODS 3
Zorbax C8
ODS Hypersil
Spherisorb 5 ODS
Partisil ODS 2
Ultrasphere Octyl
ODS SIL X-1
µBondapak Phenil
Brownlee RP 18
µBondapak C18
Zorbax TMS
Zorbax CN
Brownlee RP 8
Brownlee RP 2
Partisil ODS
µBondapak CN

0 1 2 3 4 5

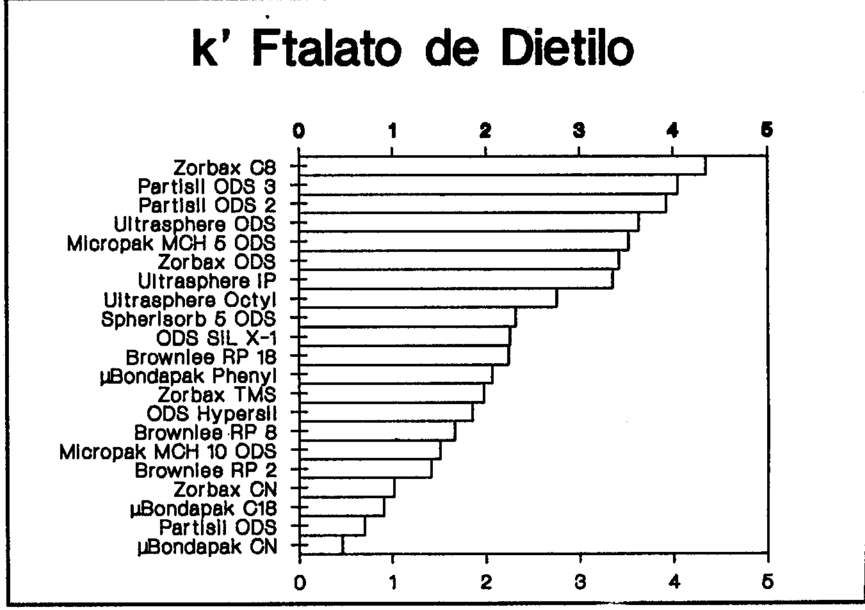


Fig. 5.7 (a). Valores hallados de k' para antraceno y dietil ftalato empleando metanol - agua (65:35) y las columnas indicadas (adaptado de referencia 25, con autorización del editor).

k' Acido Toluoico

0 1 2 3 4 5 6 7 8

Ultrasphere ODS
Ultrasphere IP
Zorbax ODS
Zorbax C8
Ultrasphere Octyl
Partisil ODS 3
Micropak MCH 10 ODS
Micropak MCH 5 ODS
Spherisorb ODS
ODS Hypersil
Zorbax TMS
Partisil ODS
µBondapak Phenil
ODS SIL X-1
Zorbax CN
Partisil ODS
Brownlee RP 18
Brownlee RP 8
µBondapak C18
Brownlee RP 2
µBondapak CN

0 1 2 3 4 5 6 7 8

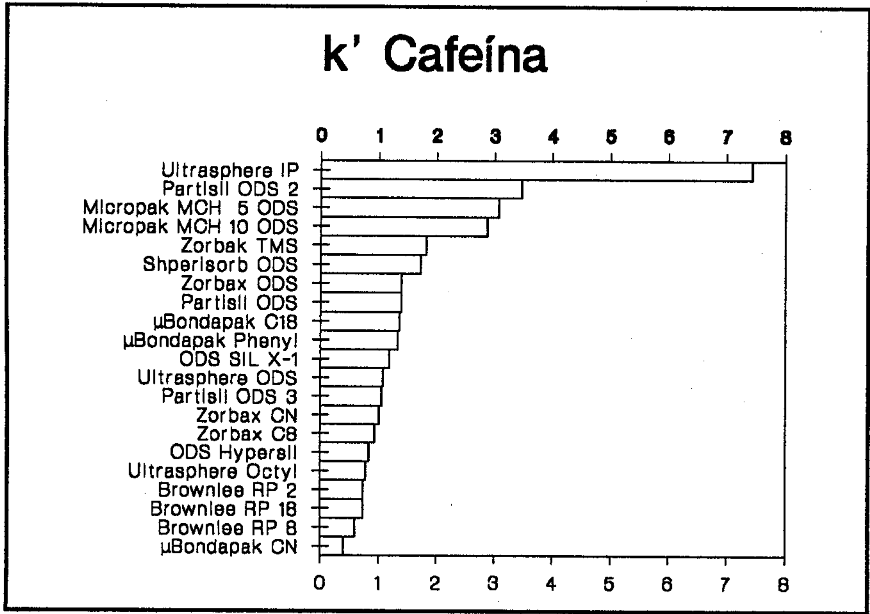


Fig. 5.7 (b). Valores hallados de k' para ácido toluoico y cafeína empleando acetonitrilo - acetato de sodio 10 mM, pH 4.5 (20:80) y las columnas indicadas (adaptado de referencia 25, con autorización del editor).

MODIFI-CACION	**Grupo ligado a Silicagel**	**Aplicaciones, comentarios**
C1 ***C2*** ***C4*** ***C6***	$-CH_3$ metil $-CH_2-CH_3$ etil $-(CH_2)_3-CH_3$ butil $-(CH_2)_5-CH_3$ hexil	RP para compuestos muy retenidos en C18. Análisis más rápidos que con C18. Análisis de péptidos y proteínas.
C8	$-(CH_2)_7-CH_3$ octil	RP de empleo general. Algo menos en IPC. Menos retentiva y mas rápida que C18.
C18	$-(CH_2)_{17}-CH_3$ octadecil (ODS)	RP y IPC, de empleo general. Es el relleno más empleado en RP y en HPLC en general.
FENIL (Phe)	$-(CH_2)_3$-Phe fenilpropil	RP e IPC (menos). Para compuestos moderadamente polares. Retención similar a C8, pero con mayor selectividad hacia compuestos aromáticos.
CIANO (CN)	$-(CH_2)_3-CN$ cianopropil	RP (solventes polares) y NP (solventes no polares). Alternativa con ventajas (ver texto) a la silicagel no modificada en NP. En RP, retención moderada, con selectividad hacia dobles y triples enlaces.
NITRO (NO2)	$-(CH_2)_3-Phe-NO_2$ nitrofenilpropil	Separación de compuestos con doble enlaces y aromáticos (PAH) en NP.
AMINO (NH2)	$-(CH_2)_3-NH_2$ aminopropil	Material multipropósito: en **NP** como alternativa de selectividad a CN, NO2 y silicagel; en **RP** muy empleada en análisis de carbohidratos; en **IEC** como intercambiador aniónico débil, con buffers como fase móvil. Solvente y muestra deben estar libres de cetonas y aldehidos.
DIOL (OH)	$-(CH_2)_3-O-CH-CH_2$ (con OH en CH y en CH_2) diol OH OH	NP, RP y SEC. Menos polar que la silicagel no modificada, pero más polar que CN. Retención moderada en RP. Menos estable.
N(CH3)2	$-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	Intercambiador aniónico débil (WAX).
$-SO_3Na$	$-(CH_2)_3-Phe-SO_3^-$	Intercambiador catiónico fuerte (SCX).
$-N(CH_3)_3^+$	$-(CH_2)_3-Phe.NMe_3^+$	Intercambiador aniónico fuerte (SAX).
-COONa	$-COO^-$	Intercambiador catiónico débil (WCX).

Tabla 5.III. Tipos de relleno de fase ligada.

5.3 Cromatografía en fase reversa

La difusión de la fase reversa se debe a un factor clave: la silicagel (como también la alúmina), es un material fuertemente higroscópico. El agua adsorbida, que forma capas simples o múltiples alrededor de la partícula y llega a tapar sus poros, es responsable de la pérdida de actividad de la fase estacionaria en fase normal, o al menos, conduce a mecanismos mixtos de retención: por una parte, fenómenos de adsorción debidos a los silanoles superficiales de la fase estacionaria y por otra, a mecanismos de partición entre la fase móvil y el agua retenida sobre la fase estacionaria.
Empleando solventes no polares (ver figura 5.8), la retención será mayor en silicagel sin agua adsorbida y la retención disminuirá con el aumento del agua adsorbida al relleno.
La consecuencia de esto es clara. Para conseguir resultados reproducibles en fase normal, se debe controlar rigurosamente la humedad de los solventes. Sin embargo, esto no resulta tan sencillo como podría parecer ya que ni la "humectación" de la silicagel ni la de los solventes no polares son procesos rápidos, al menos en relación a los tiempos que se pretende manejar en estas metodologías y la humedad del sistema puede variar durante el transcurso del día por factores ambientales, humedad de recipientes, etc.
Snyder y Kirkland[11] recomiendan emplear fases móviles isohídricas (50 % de saturación de agua). Si se emplean solventes relativamente polares, otra solución podría consistir en el agregado intencional de agua, en pequeñas proporciones. Sin embargo, deberá reconocerse que el mecanismo de separación no será debido a un proceso de adsorción "puro", sino una mezcla de adsorción-partición.
Por otra parte, la naturaleza de los grupos funcionales de la silicagel, fuertemente activos, puede dar lugar a otros tipos de fenómenos indeseados. Los silanoles superficiales son débilmente acídicos y esta característica puede provocar fuerte retención, a veces irreversible de compuestos básicos, la deshidratación de alcoholes lábiles y pueden incluso comportarse como intercambiadores iónicos débiles, con capacidad de retener iones metálicos de actividad catalítica.
Estas dificultades llevaron las preferencias del analista hacia otro tipo de material, en el cual la reactividad de los grupos activos en términos cromatográficos no fuera tan intensa y donde el contenido de agua, de control no siempre tan simple, no incidiera de tal forma sobre los resultados.
Como se discutirá más adelante, las ventajas de la cromatografía en fase reversa pueden resumirse así:

- Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil.
- La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil.
- La adsorción irreversible, frecuente en silicagel, raramente ocurre.
- La fase móvil predominante es agua, abundante y económica.
- El modificador orgánico predominante, metanol, es asequible en calidad y precios

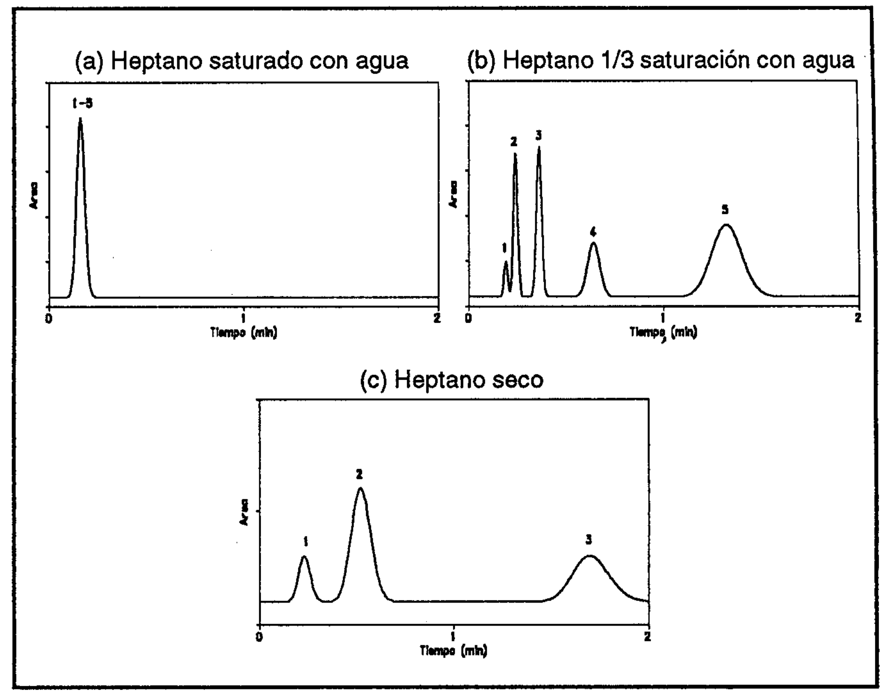


Fig. 5.8. Efecto del agua sobre una separación en fase normal. Fase estacionaria: Perisorb A (Silicagel 60, área superficial 14 m^2/g). Fase móvil: heptano seco, al tercio y al 100 % de saturación con agua. Compuestos separados: (1) benceno, (2) bifenilo, (3) m-terfenilo, (4) m-tetrafenilo y (5) m-pentafenilo. (Cortesía de E. Merck).

adecuados.

- El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito.
- Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil.

La Fase Móvil

La fase móvil en RPLC está en general constituída por un solvente polar, mezcla de agua y un modificador orgánico, a los que se podrá según veremos agregar aditivos, sales o buffers. A mayor proporción de modificador orgánico corresponde menor retención (menor k') y a mayor proporción de agua, mayor retención (mayor k').

Se considera que la selectividad del sistema está dada por el modificador, en función de su capacidad aceptora o dadora de protones y momento dipolar, propiedades que determinarán el tipo y magnitud de la interacción con la muestra (ver figura 5.9). Es así que Snyder[29,30] clasificó los solventes de uso habitual en HPLC en 8 grupos según el tipo

y magnitud de estas interacciones y dispuso estós grupos en un diagrama triangular (ver figura 11.9). Los solventes de mayor empleo en RPLC son, además del agua, metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano, situados en grupos diferentes y opuestos en la clasificación de Snyder. Se considera que el agua actúa como carrier y no aporta selectividad al sistema, la que estará dada por el modificador orgánico, los aditivos, el valor de pH, etc. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que ésto puede no ser siempre cierto. Así por ejemplo, Glajch[31] encontró que el naftaleno eluía en un sistema de fase reversa con k'=4 en MeOH 63 % y con k'=5.2 en THF 39 %, mientras en con una mezcla 50:50 de esos solventes, para la cual podría esperarse un k' intermedio, se obtuvo un k'=6.
MeOH, AcN y THF pueden considerarse, entonces, como los vértices del triángulo de selectividades en fase reversa, de modo que constituyen la batería necesaria y en general suficiente para obtener la resolución adecuada en este sistema. Otros solventes empleados en menor grado son acetona, dioxano, dimetilsulfóxido, iso-propanol, etc, cuyo empleo está en algunos casos limitado por transparencia al UV y la viscosidad, aunque el agregado de pequeñas proporciones de los mismos puede mejorar la selectividad sin mayor perturbación al sistema.

Mecanismo de retención

A pesar de haber sido ampliamente estudiado, aún no se comprende totalmente el mecanismo de retención en fase reversa. Se ha sugerido que el modo de interacción entre el soluto y la fase ligada puede ser de tres tipos, **partición** del soluto entre la fase móvil y una fase estacionaria líquida, **adsorción** sobre una fase estacionaria sólida, o bien un **proceso mixto partición-adsorción.**
Si bien la hipótesis de partición puede tener algún sustento en el caso de materiales poliméricos, es poco probable en los monoméricos, los de mayor difusión. Es claro que una capa monomolecular no puede comportarse como un líquido.
En RPLC, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es muy polar (en general mezcla de agua y un modificador orgánico, MeOH, AcN o THF). Como el material de relleno de la columna es no polar, las únicas fuerzas de interacción posibles deberían ser las de Van der Waals, descartándose la priori otras interacciones, por ejemplo, puentes de hidrógeno, formación de complejos, interacción iónica, etc. Sin embargo, las fuerzas de Van der Waals no bastan por sí mismas para justificar la retención observada.
La ***teoría solvofóbica*** de Horváth[48,49] es probablemente la de mayor aceptación. Según ésta, la fuerza de retención en fase reversa se debe al aumento de entropía que acompaña a la transferencia del soluto de la fase móvil (polar) a la fase estacionaria (no polar). Dicho de otro modo, la interacción entre moléculas de soluto y de solvente es mucho más débil que la interacción de las moléculas de solvente entre sí. Como consecuencia, **el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar en la fase estacionaria, que actúa como receptor pasivo.** La figura 5.10 muestra como ejemplo la interacción de fenol con la fase ligada. En este caso, puede asumirse que el grupo polar se orienta hacia la fase

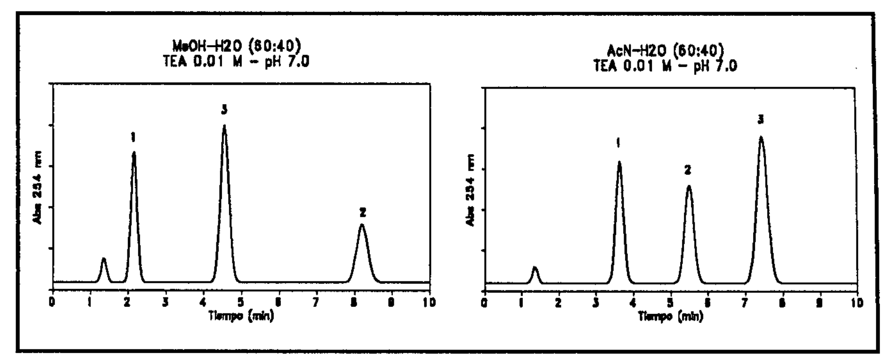


Fig. 5.9. Cambio de la selectividad por variación del modificador orgánico. Separación de (1) clorazepato dipotásico, (2) N-desmetildiazepam y (3) sulpirida en una columna LiChroCART 125-4 con LiChrospher RP18. Notar la inversión del orden de elución de (2) y (3) al cambiar metanol por acetonitrilo. Del autor, resultados no publicados.

móvil acuosa, mientras que su porción hidrofóbica lo hace hacia la superficie hidrocarbonada. La magnitud de la interacción soluto-BP (y la retención) será mayor cuanto mayor sea el tamaño del grupo apolar y consecuentemente, la superficie de contacto. Por el contrario, las funciones polares del soluto favorecerán la interacción con los solventes polares y reducirán la retención.

En la práctica, sin embargo, el mecanismo de retención se complica por la presencia de silanoles residuales. Así, para comprender el fenómeno de la retención deberían considerarse dos mecanismos, el silanofóbico y el silanofílico.

La Cadena Hidrocarbonada

Como ha sido indicado en la tabla 5.III, el tipo de sustituyente más empleado en fase reversa es de tipo alquílico, especialmente C18 y en menor proporción C8, con o sin end capping, con menor o mayor grado de cobertura (capa monomérica o polimérica). En RPLC, se observa que para igual carga de carbono, a mayor longitud de cadena corresponde mayor retención y para igual longitud de cadena alquílica, a mayor cobertura, mayor retención.

Berendsen[32] observó que la retención (log k') de una serie de solutos aumenta con la longitud de la cadena hidrocarbonada de la fase ligada. La figura 5.11, permite llegar a varias conclusiones. En primer lugar, se comprueba que a mayor hidrofobicidad del soluto corresponde mayor retención. Al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada de C1 a C22, la retención aumenta como máximo en un factor de 10, a diferencia de la variación de retención que puede obtenerse por adición de un modificador orgánico, en cuyo caso la retención se reduce en un factor de 2 a 3 por cada 10 % de modificador

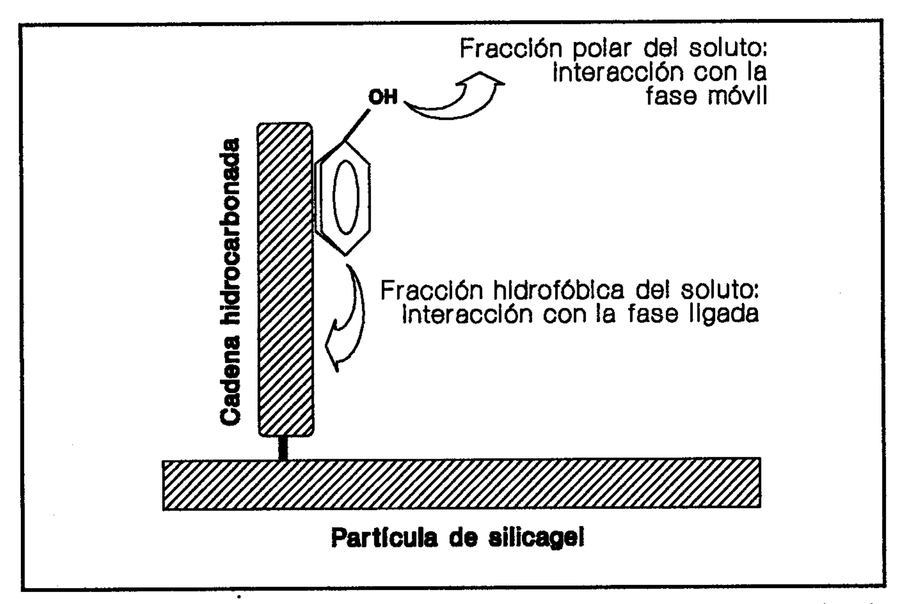


Fig. 5.10. Mecanismo de retención en fase reversa. Interacción de fenol con la fase estacionaria y la fase móvil (ver texto).

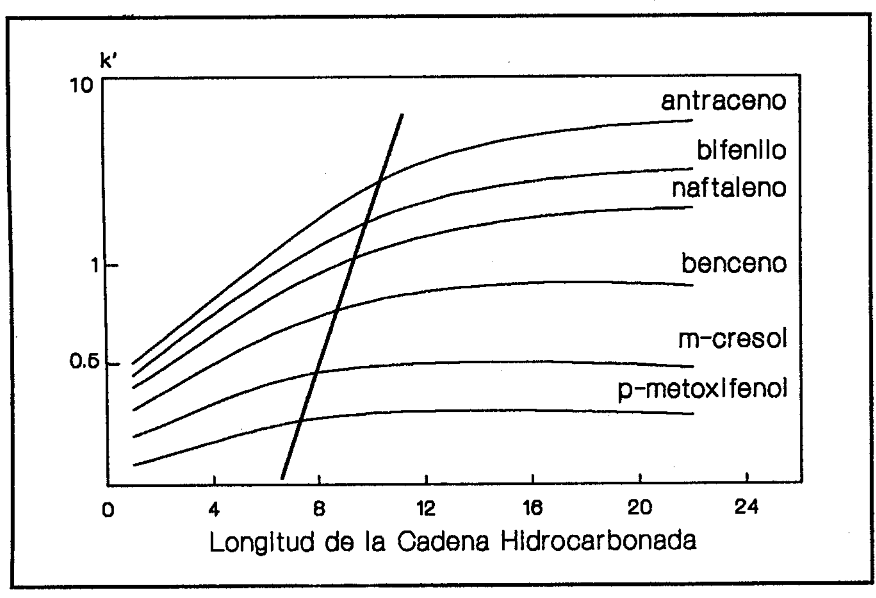


Fig. 5.11. Retención en función de la longitud de la cadena hidrocarbonada de la BP. Fase móvil: MeOH-H_2O (80:20). La recta indica la longitud de cadena crítica (ver texto). De referencia 32, con permiso del editor.

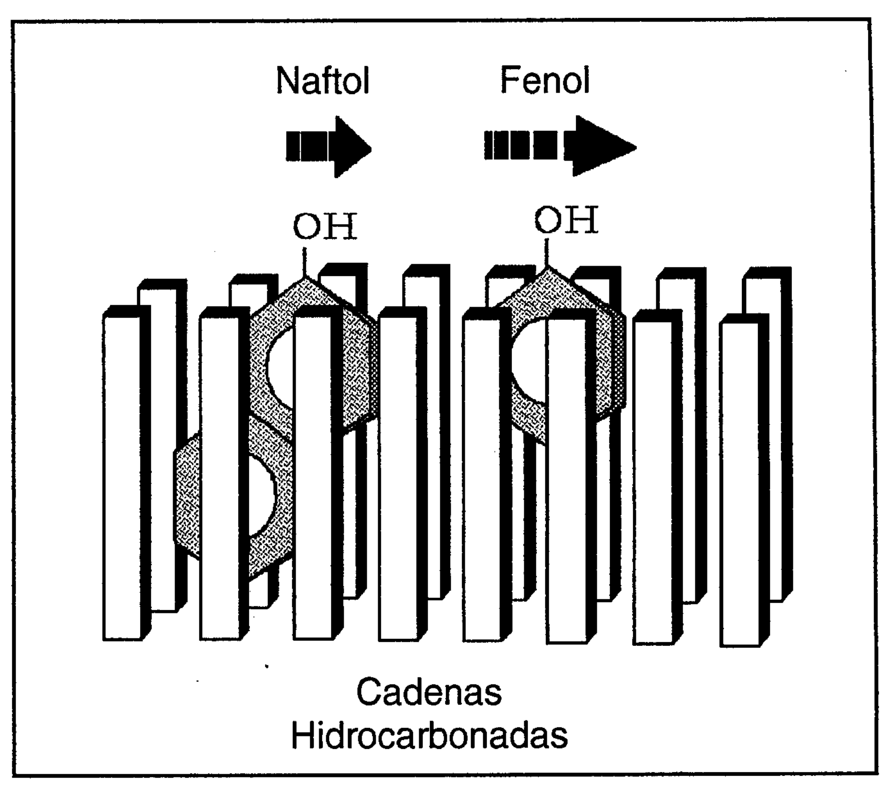


Fig. 5.12. Influencia de la longitud de la cadena hidrocarbonada en la separación de dos solutos de diferente tamaño molecular (ver texto).

agregado. Así, la influencia de la fase móvil sobre la selectividad en RP es mucho mayor que la debida a la fase estacionaria. Además, para cada soluto, el aumento de la retención continúa hasta llegar a un plateau. Esto indicaría la existencia de una determinada "longitud de cadena crítica", por encima de la cual una mayor elongación de la cadena hidrocarbonada de la BP ya no tiene efecto. La extrapolación de las ramas ascendente y plateau de cada curva define una serie de puntos que pueden unirse por una recta. Esta recta, de pendiente positiva, indica que a mayor k' (correspondiente a mayor tamaño de la porción hidrofóbica del soluto), corresponde mayor longitud de la cadena crítica.

Aparentemente, la porción terminal de la cadena hidrocarbonada de la BP es la que participa en el proceso de separación (ver figura 5.12). Consideremos, por ejemplo, la penetración de dos solutos en una BP de cadena larga. Si uno de ellos posee un grupo apolar de mayor tamaño, la superficie de contacto con la fase estacionaria será mayor y se retendrá más. Si las cadenas fueran muy cortas, la diferenciación entre ambos solutos sería menor y si el soluto fuera de gran tamaño molecular, solo cadenas largas podrían

separarlo eficientemente. Berendsen describe el fenómeno como una "absorción", más que una "adsorción".
Probablemente por esta causa las columnas de C18 se emplean para propósitos generales. Algunos trabajos[56] sugieren incluso el uso de columnas de C22 como alternativa a la de C18. Sin embargo, las columnas de cadena corta producen picos más simétricos que las de cadena larga[33], probablemente porque los silanoles libres, más accesibles, interaccionan con los solventes polares de la fase móvil, permitiendo la solvatación de la fase estacionaria y con ello, un equilibrio más rápido.

Formas de Cromatografía en Fase Reversa

La cromatografía en fase reversa puede clasificarse, según su forma operativa en:

- RP Regular o Cromatografía de Partición Simple
- Control de la Ionización (Supresión Iónica)
- Cromatografía de Apareamiento Iónico
- Complejación con Iones Metálicos
- RP en Medio No Acuoso

RP Regular o de Partición Simple

Al no conocerse aún con certeza el mecanismo separativo que opera en fase reversa, probablemente lo más adecuado sea denominar su expresión más común como "Regular". Sin embargo y a los fines prácticos, puede considerarse como una partición simple, teniendo en cuenta las limitaciones de dicha definición. Hecha esta salvedad, podemos decir que esta forma de RP es la que emplea como fase móvil una mezcla de agua y un modificador orgánico, MeOH, AcN o THF, en mezclas binarias, ternarias y en casos complejos, aún cuaternarias.
La retención está gobernada por la hidrofobicidad del soluto. A mayor polaridad del soluto, mayor predilección de éste por la fase móvil y menor tiempo de retención. Los solutos no polares tendrán comportamiento inverso.
A los efectos directos de la hidrofobicidad se suman, naturalmente, las interacciones debidas a la capacidad donadora o aceptora de protones y momento dipolar individuales de soluto, solvente y fase estacionaria. Estas interacciones son además responsables de la selectividad del sistema.
En cuanto a la fase móvil, como ya se indicó, a mayor proporción de agua, mayor retención y a mayor proporción de modificador orgánico, menor retención. Estos modificadores tienen a su vez su propia "fuerza eluotrópica" ($\in$), determinada, entre otros, por Snyder (ver tabla 11.III). Así, la fuerza de elución decrece en el orden THF > AcN > MeOH > H_2O ($\in$: 4.5 - 3.2 - 2.6 - 0.0 respectivamente).

Control de la Ionización (Supresión Iónica)

En general, los solutos ionizables dan picos con baja retención y fuerte asimetría. Este fenómeno no puede, lamentablemente, ser corregido variando la proporción del modificador orgánico. Sin embargo, la solución puede ser muy simple.
Si consideramos un ácido orgánico de cadena corta, es conocido que en solución coexistirá como la suma de sus formas iónica y no iónica y lo mismo ocurrirá con una base orgánica.

$$R - COOH \rightleftharpoons R - COO^- + H^+ \quad (5\text{-}2)$$

$$R - NH_2 + H^+ \rightleftharpoons R - NH_3^+ \quad (5\text{-}3)$$

Independientemente del caso estudiado, es evidente que en RP solo se retendrá favorablemente la especie no iónica y lo hará mal la iónica, que resulta muy polar. Es decir, la retención de solutos no ionizables depende fuertemente de la posición que adopte el equilibrio entre ambas formas. Así, los factores que modifican ese equilibrio, ya sean pH o fuerza iónica, modificarán la retención. Si el analito se encuentra disociado, el equilibrio debe desplazarse hacia la forma no ionizada para lograr la retención.
El caso de los ácidos carboxílicos es el de resolución más simple, ya que un pH entre 2 y 4 es en general suficiente para impedir la ionización. Las bases, por el contrario, necesitan un pH superior a 7-8, valor incompatible con el material de base sílica. Se ha descrito[38] sin embargo el uso de columnas de fase reversa a pH 11-13, durante varias semanas sin alteración apreciable del material (medida por liberación de silicatos por absorción atómica, microscopía, variación de k', resolución, etc). El autor consiguió así la separación de alcaloides del ergot, ajustando el pH por medio de alquilaminas (TEA, DEA, EA, TMA). Por el contrario, las bases fuertes (NaOH, hidróxidos de amonio cuaternario), degradaron rápidamente el material.
El término "control de la ionización" se prefiere a "supresión iónica", ya que lo que se busca es controlar la separación, no necesariamente favoreciendo la presencia de la forma no disociada de todos los solutos. Un ejemplo es el indicado en la figura 5.13, en la cual se busca separar los productos de degradación del ácido benzoil fenil propiónico. En este caso, el empleo de un pH ácido permite la "retención apropiada" de la forma no disociada del soluto, pero resulta solapado con uno de los productos de degradación. Si lo que se desea es evaluar solo los productos de degradación, un pH más elevado llevaría a la no disociación del ácido benzoil fenil propiónico, que sería menos retenido. De esta forma, se consigue separar la droga madre de sus productos de degradación, aunque quizás, ya no resulte apropiada para cuantificar la primera. El control adecuado del pH en función de los solutos (y de su pKa) permite controlar y ajustar la separación. Más adelante, en el capítulo 11, veremos la forma de regular la separación en función del pH por medio de un diagrama de ventanas.

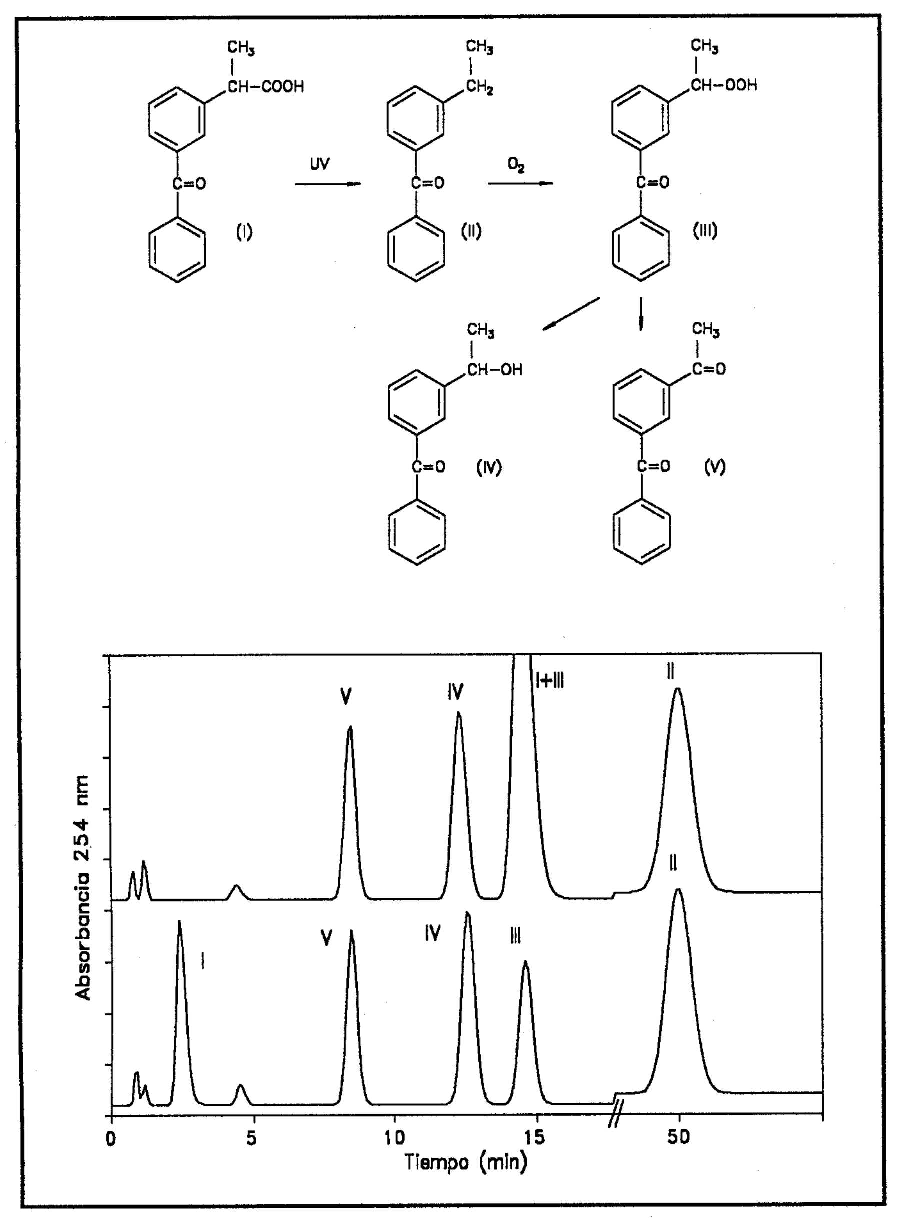


Fig. 5.13. Separación de ácido benzoil fenil propiónico (I) de sus productos de fotólisis: 3-benzofenil etano (II), 3-benzofenil etil hidroperóxido (III), 3-benzofenil etanol (IV) y 3-benzofenil etanona (V). Columna: LiChroCART RP18, AcN - buffer(50:50) y (37:63), a pH 3.0 (cromatograma superior) y a pH 6.5 (cromatograma inferior). Adaptado de referencias 53 y 54.

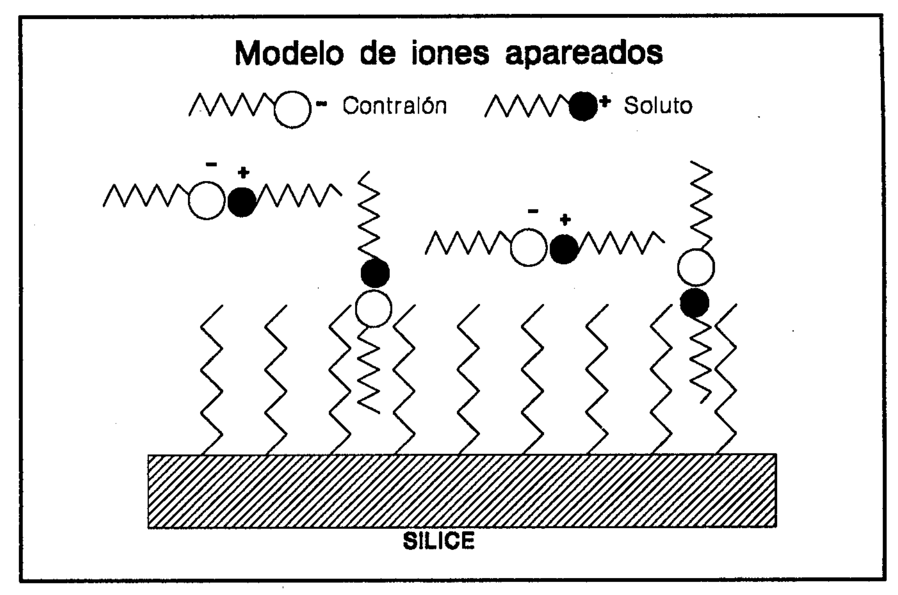


Fig. 5.14. Modelo de iones apareados en IPC. Analito y contraión forman un complejo que se particiona entre fase móvil y fase estacionaria.

Cromatografía de Apareamiento Iónico

Frecuentemente nos encontramos con estructuras altamente hidrofílicas. Bases, o ácidos orgánicos que se mantienen en forma iónica dentro de los rangos de pH habituales o recomendados para preservar la integridad del relleno de fase reversa. Estos casos no pueden ser resueltos por control de la ionización, ya que llegar a la forma no iónica implicaría un pH demasiado ácido como para evitar la hidrólisis de la fase ligada, o demasiado alcalino como para evitar la disolución de la silicagel. En estos casos, es preferible mantener el estado iónico del analito, aplicando la cromatografía de apareamiento iónico (IPC, ion pair chromatography).

En IPC, la fase móvil contiene un ***contraión***, es decir, una especie química de carga opuesta a la del analito. Puede suponerse, en un modelo muy simplificado (ver figura 5.14), que analito y contraión forman un complejo "neutro" que se transporta como tal dentro de la columna, particionándose entre la fase móvil y la fase estacionaria. Así:

$$X_{fm}^{+} + C_{fm}^{-} \rightleftharpoons [XC]_{fm} \rightleftharpoons [XC]_{fe} \qquad (5\text{-}4)$$

Siendo respectivamente X_{fm}, C_{fm} y $[XC]_{fm}$ el analito, contraión y complejo en la fase móvil, éste último particionado con $[XC]_{fe}$, el complejo en la fase estacionaria.

A diferencia de la "supresión iónica", aquí trataremos que el analito esté en su forma

iónica (necesaria para el apareamiento), regulando el pH a 6.5-7.5 para el tratamiento de ácidos y a pH 2.5-3.5 para el de las bases.
El tipo de contraión dependerá de la funcionalidad del analito. Para las bases, formadoras de cationes, se emplean contraiones aniónicos, en especial alquil sulfonatos (butil a dodecil sulfonato de sodio) y para los ácidos (formadores de aniones), compuestos de alquil amonio (tetrabutil, tetraetil, tetrametil amonio, o trimetil alquil amonio, donde el alquilo puede corresponder a una serie de homólogos de C4 a C12). Por ejemplo, para un analito catiónico con octil sulfonato de sodio y para un analito aniónico con tetrabutil amonio, al pH apropiado, será:

$$R\text{-}NH_3^+ + C_8H_{15} . SO_3^- \rightleftharpoons [R\text{-}NH_3 . O_3S . C_8H_{15}] \qquad (5\text{-}5)$$

$$R\text{-}COO^- + N\,(C_4H_7)_4^+ \rightleftharpoons [R\text{-}COO . N\,(C_4H_7)] \qquad (5\text{-}6)$$

La retención (ver tabla 5.IV) puede ser regulada, como en RPLC regular, por la "fuerza" de la fase móvil (concentración del modificador orgánico), pero también por el tamaño de la cadena alquílica (y consecuentemente por la hidrofobicidad) del contraión y por su concentración, generalmente entre 5 y 20 mM.
Es importante notar que mientras los solutos iónicos pueden ser manipulados con el contraión, la baja concentración de éste tendrá un efecto mínimo sobre la retención de los compuestos no iónicos, que eluyen según las reglas de la RPLC regular.
En otras palabras, **IPC permite la separación de solutos iónicos y no iónicos en un mismo cromatograma**, con una única fase móvil.
Por ejemplo, en la figura 5.15 puede verse la separación de Nafazolina de varios conservadores en un spray nasal. La utilización de varios alcano sulfonatos (pentano a octano sulfonato de sodio) permite regular la retención de Nafazolina, mientras que la de los conservadores permanece prácticamente invariable.
Para la utilización de este método, deben tenerse en cuenta algunas consideraciones:
Las columnas de IPC deberán reservarse para su uso exclusivo en esta modalidad, ya que no puede asegurarse la remoción total del contraión y la selectividad de la columna puede modificarse en forman permanente. El modificador orgánico de primer elección es el metanol, por su mayor capacidad de disolución de las sales inorgánicas empleadas para elaborar los buffers. La columna de elección es, preferentemente, C18, por su mejor cobertura y estabilidad. Concluida la separación, la columna deber lavarse con metanol al 50 % o menos en agua, para eliminar las sales (20 volúmenes de columna son en general suficientes).

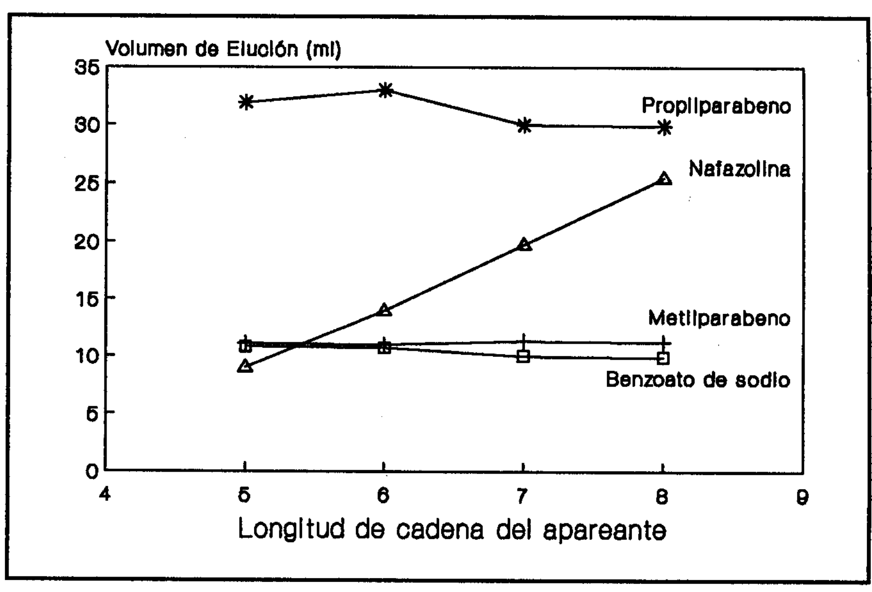


Fig. 5.15. Separación de Nafazolina de varios conservadores por IPC. La elección entre una serie de alcano sulfonatos como contraión permite regular la retención de la base. Adaptado de referencia 55.

Variable	Efecto
● Dimensión del contraión	A mayor dimensión (lipofilicidad), mayor retención.
● Tipo de modificador orgánico	A mayor fuerza, menor retención (THF > AcN > MeOH).
● Concentración del modificador	A mayor concentración, menor retención.
● Concentración del contraión	A mayor concentración, mayor retención.
● Fase estacionaria	A mayor lipofilicidad o a mayor cobertura, mayor retención.
● Temperatura	A mayor temperatura, menor retención.
● pH	Depende del soluto.

Tabla 5.IV. Variables de la cromatografía de apareamiento iónico.

Mecanismo de IPC

Se han propuesto varios modelos de retención. El mecanismo de **iones apareados**[35], ya descrito y representado en la figura 5.14, no está de acuerdo a ciertas evidencias experimentales (titulaciones conductimétricas), por lo que se han propuesto mecanismos alternativos.

El modelo de **intercambio iónico dinámico**[36] (figura 5.16) postula que el contraión se adsorbe a las cadenas alquílicas de la fase estacionaria, actuando luego como un intercambiador iónico. Este modelo se acerca más a la evidencia experimental, pero no explica porqué, en algunos casos, un soluto con carga (-2) se retiene menos que otro de carga (-1) en presencia de la carga opuesta del reactivo de apareamiento.

El modelo de **interacción iónica**[37] (figura 5.17) postula la cooperación de dos fuerzas de retención: una fuerza electrostática y una interacción lipofílica. Según esta hipótesis, existe una doble capa. El reactivo de apareamiento se adsorbe, por atracción lipofílica, formando una capa primaria, próxima a la partícula. La capa primaria queda (por ejemplo) con una carga negativa, dada por el alquilsulfonato. Para mantener la electroneutralidad, se forma una capa secundaria con iones positivos (Na^+ o K^+) y circundando a ésta, la fase móvil contiene iones negativos (contraión, aniones del buffer) y positivos (cationes, soluto). El soluto se retiene por la siguiente secuencia:

1. El soluto compite con los otros iones y accede a la capa secundaria.
2. El soluto es atraído electrostáticamente hacia la capa primaria.
3. El soluto es adsorbido por interacción lipofílica a la fase ligada y se retiene en la capa primaria.
4. La capa primaria queda eléctricamente cargada, atrayendo contraiones de carga opuesta, para mantener su electroneutralidad. Así, **un par de iones, pero no necesariamente un par iónico**, ha ingresado a la capa primaria.
5. Por la secuencia inversa, se desorbe un par de iones, pero no necesariamente el mismo par adsorbido.

Finalmente, el modelo de **intercambio dinámico de complejo**[38] asume que contraión y soluto forman un complejo en la fase móvil y el complejo circula por la columna intercambiando el soluto entre el par iónico de la fase móvil y el contraión retenido en la fase estacionaria. Evidentemente, es mucho lo que resta saber sobre el mecanismo real de separación en IPC, que probablemente y según las condiciones puntuales, incluye más de uno de los mecanismos postulados.

Las figuras 5.18 y 5.19 muestran dos ejemplos de aplicación de IPC. En el primer caso, Atenolol, un bloqueante ß-adrenérgico de características químicas básicas, puede separarse de sus subproductos de síntesis empleando alquilsulfonatos en medio ácido. En el segundo, una mezcla de ácidos orgánicos son separados a un pH tal que favorece su forma disociada, empleando hidróxido de tetrabutilamonio como contraión.

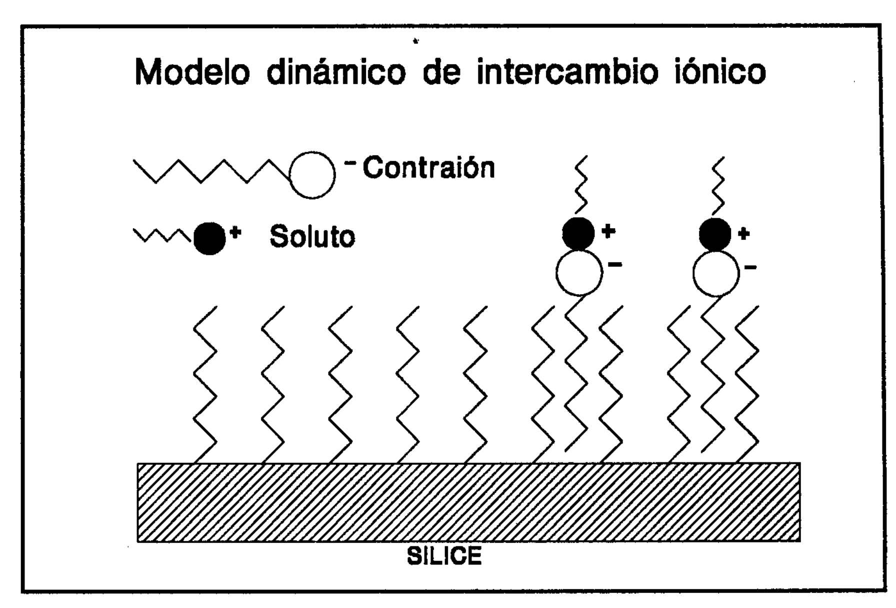


Fig. 5.16. Mecanismo de IPC según el modelo de intercambio iónico. El contraión se adsorbe sobre la fase estacionaria, formando un intercambiador iónico dinámico.

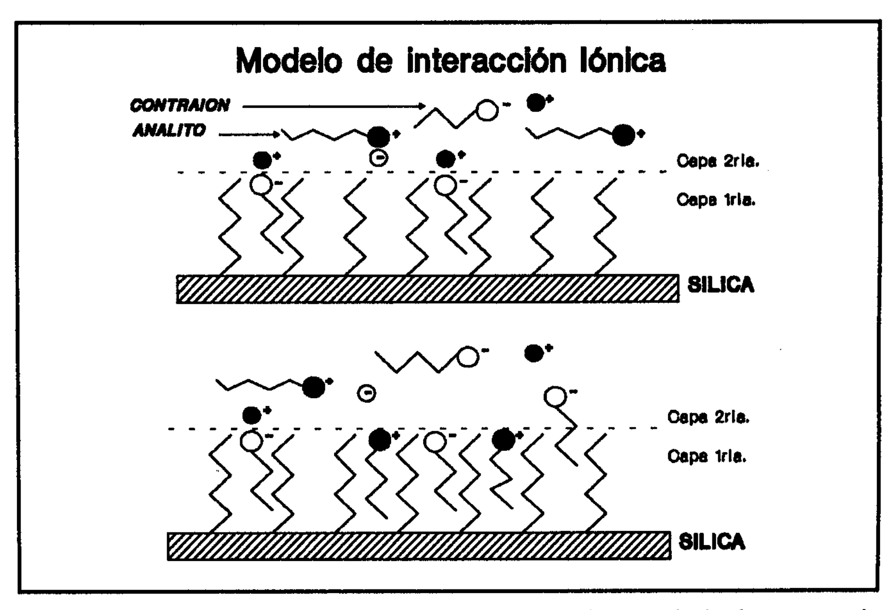


Fig. 5.17. Modelo de interacción iónica. El soluto se atrae por la suma de dos fuerzas, una de atracción lipofílica y otra de atracción electrostática (ver texto).

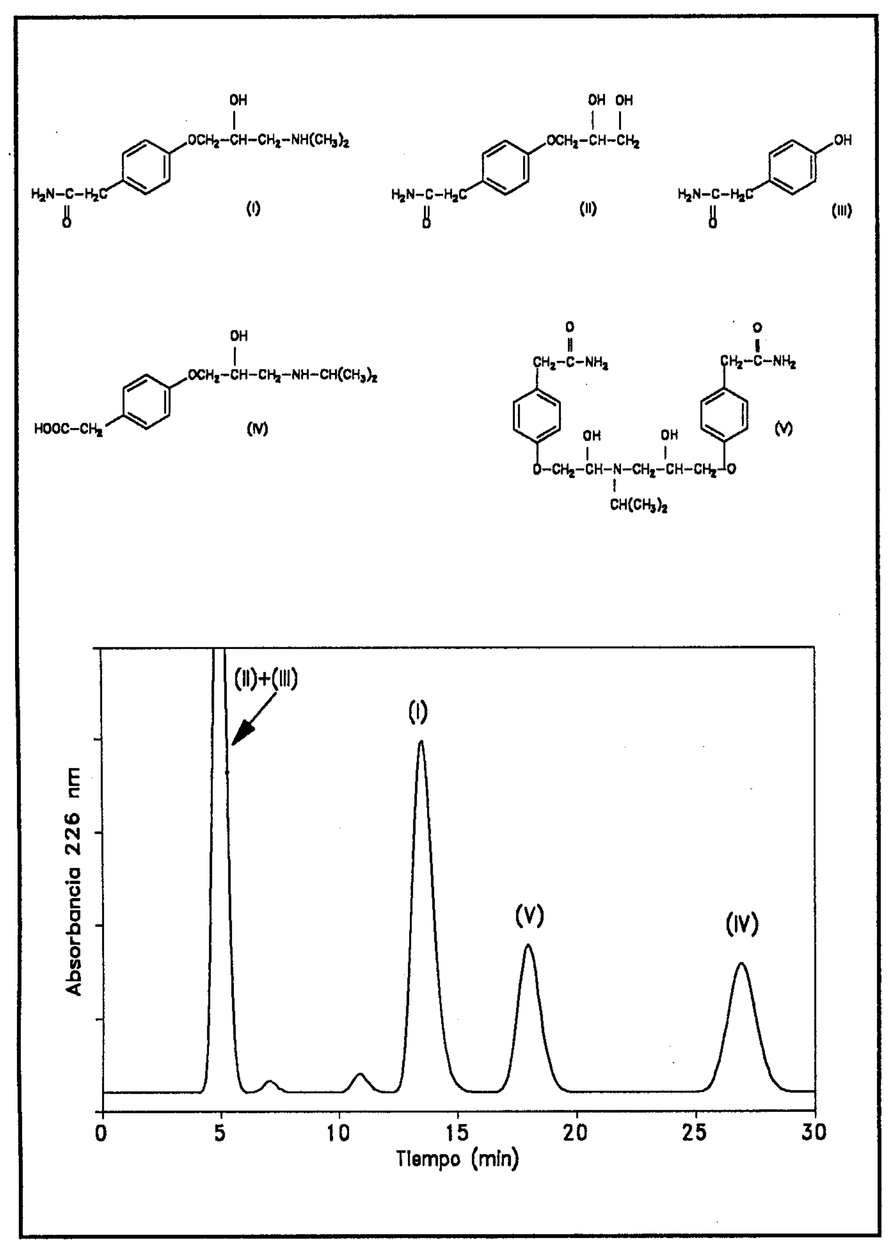


Fig. 5.18 Separación de Atenolol (I) de sus impurezas de síntesis:diol (II), p-hidroxifenil acetamida (III), ácido bloqueante (IV) y amina terciaria (V), según Farmacopea Británica 1988. Columna: LKB Superpac ODS2, fase móvil: octil sulfonato de sodio 0.166 %, H_2SO_4 10 %, metanol (600:10:400) a 0.5 ml/min.

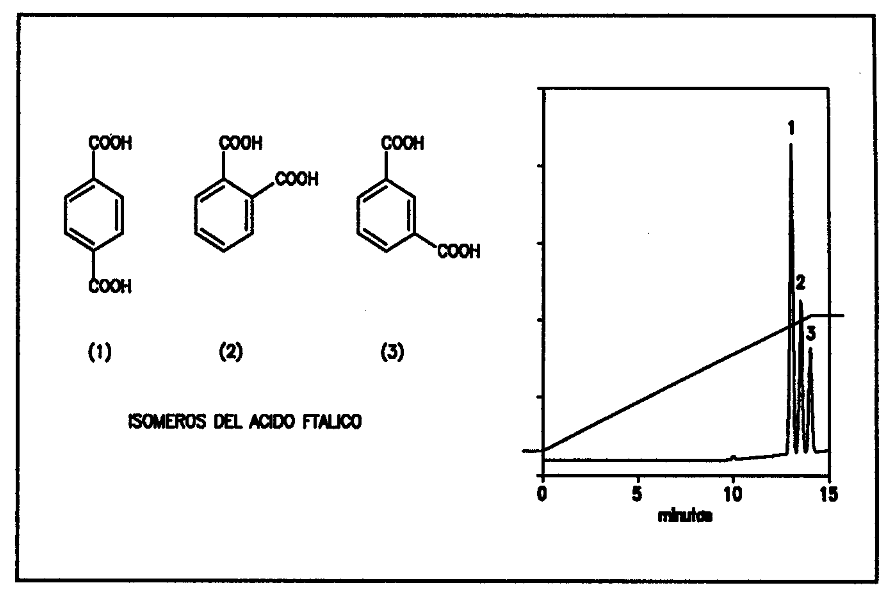


Fig. 5.19. Isómeros del ácido ftálico. Columna: µBondapak C18. Solvente A: TBA 5 mM en agua, B: TBA 5 mM en MeOH. Gradiente lineal de 5% a 40% B. Caudal: 2 ml/min, Detector UV 254 nm. Gentileza Waters Assoc.

Complejación con Iones Metálicos

Los iones metálicos fueron usados extensivamente en cromatografía desde hace décadas. Es conocido el agregado de Ag(I) a la silicagel (cromatografía de argentación) debido a su capacidad de formar complejos débiles con enlaces dobles olefínicos. La unión entre el metal y el doble enlace se produce por transferencia electrónica, entre el compuesto orgánico que actúa como donante y el metal, que funciona como aceptor de electrones[39]. La fuerza de esta unión, el complejo π, o complejo de transferencia de carga, depende de factores polares y estéricos y ha sido transferido a HPLC, especialmente para la resolución de isómeros geométricos (cis - trans), por impregnación de silicagel y posterior empaquetamiento[40-42], por impregnación "in situ" en una columna comercial preparada[43] y también, gracias a la facilidad de la fase reversa de emplear fases móviles acuosas, por adición directa del ión al solvente de elución[44].

También se emplean otros metales, por ejemplo Cu(II), Cd(II), Ni(II), Zn(II), etc, que al igual que Ag(I), habían sido utilizados adicionados a la fase estacionaria. Esta modalidad se conocía como **cromatografía de intercambio de ligandos**, por el intercambio del soluto (ligando) con iones metálicos inmobilizados en la fase estacionaria y fue transferido con éxito a la RPLC[45,46]. Así, Cooke[46] consiguió separar de sulfamidas, ácidos aromáticos, aminoácidos y dipéptidos, empleando un complejo de Zn(II) y un quelante, C_{12}-dien, constituido por una estructura semirrígida con un centro local de carga positiva (figura 5.20). Este autor indica que pueden formarse dos tipos de complejo metal-soluto,

el de "esfera interna", en el cual metal y soluto se unen directamente y el de "esfera externa", aplicable al caso de quelatos Zn(II)-C_{12}-dien, donde la asociación metal-soluto ocurre sin perturbación del centro esférico de coordinación del metal. En el último caso, la velocidad de formación y de disociación del complejo son procesos rápidos, factor de gran importancia para mantener una buena eficiencia cromatográfica.

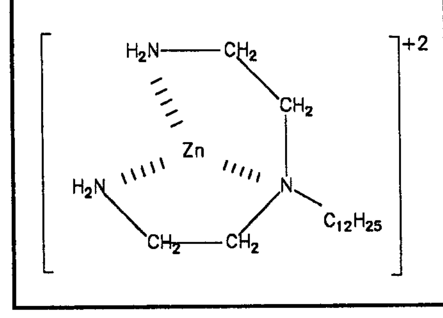


Fig. 5.20. Complejo del Zn(II) y C12-dien.

RP en Medio No Acuoso

En algunos casos, el soluto puede ser completamente insoluble en metanol, acetonitrilo o THF y sus mezclas con agua. Estas muestras (aceites, grasas, hidrocarburos, etc), altamente lipofílicas, pueden ser resueltas en NP. Sin embargo, la RP empleada con fase móvil de baja polaridad, sin agua agregada, tiene muchas veces la suficiente selectividad y poder de retención para permitir su resolución. La figura 5.21 muestra una aplicación de este sistema para el análisis de una mezcla de esteroides, uno de los cuales (3,17-DUE, por la sustitución en ambos hidroxilos) es muy apolar.

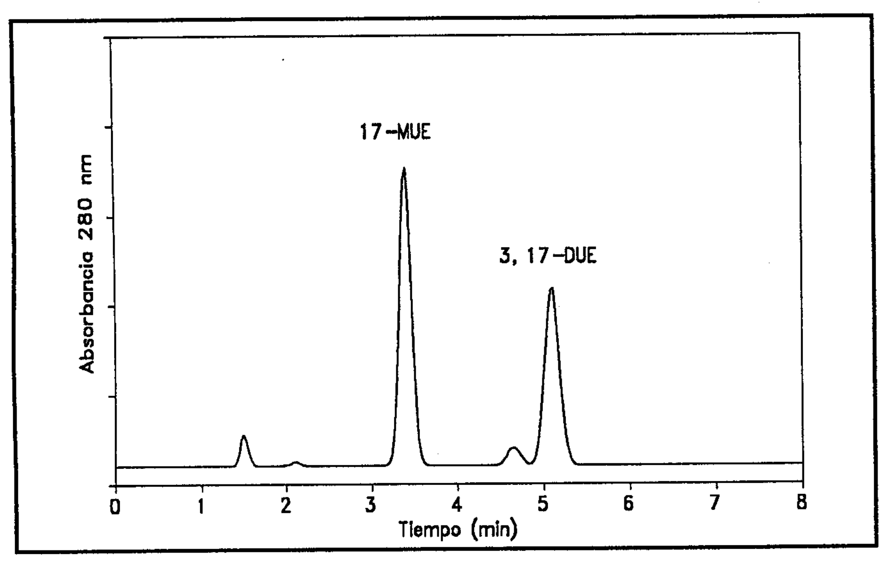


Fig. 5.21. Separación en RP no acuosa de 17-monoundecilenato (17-MUE) y 3,17-diundecilenato de estradiol (3,17-DUE). Columna: LiChroCART con LiChosper 125-4 RP18, solvente: AcN-cloroformo (90:10) a 0.8 ml/min. Adaptado de referencia 47.

5.4 Cromatografía en Fase Normal

Ya se han discutido los inconvenientes derivados de materiales altamente polares e higroscópicos como la silicagel y alúmina, que han favorecido el empleo de la fase reversa. Sin embargo, la selectividad única de estos materiales, especialmente la silicagel, hace que sigan empleándose para problemas insolubles con rellenos hidrófobos. Una alternativa apropiada en muchos casos reside en el uso de materiales de fase ligada polares (diol, ciano, nitro, amino, en orden creciente de polaridad), con fases móviles no polares. La mayor ventaja de éstos sobre los rellenos tradicionales de silicagel reside en la menor frecuencia de retenciones irreversibles, menor influencia del agua y en una respuesta mucho más rápida al cambio de solventes.

Al igual que en fase reversa, estos materiales contienen grupos silanoles libres que pueden dar lugar a retenciones inespecíficas. El resultado es, como en aquel caso, tailing y picos mal definidos para solutos muy polares. La solución, también como en fase reversa, puede hallarse fácilmente agregando 0.5 - 1 % de un ácido (fosfórico, acético) para solutos ácidos, o una base (trietilamina, propilamina) para solutos básicos.

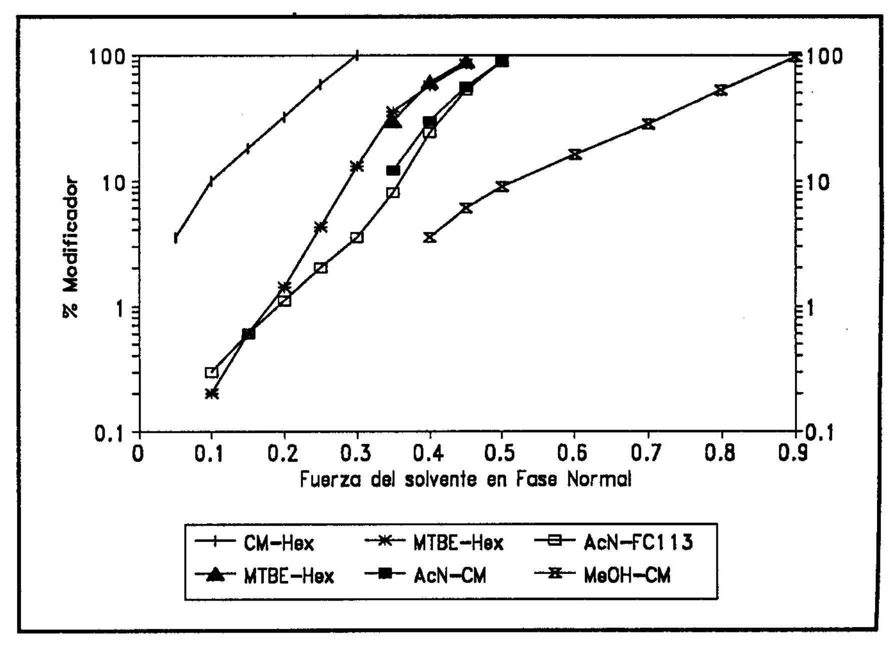


Fig. 5.22. Fuerza de solventes en NPLC. MC: cloruro de metileno; MTBE: metil terc butil eter; FC113: 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano; Hex: hexano (adaptado de referencia 51).

Las columnas ciano se comportan como la sílica desactivada, sin mayor influencia del grupo CN cuando se emplean solventes no polares[50], aunque este no sería el caso con fases móviles de mayor polaridad. Así, el desarrollo de métodos en este tipo de columnas puede llevarse a cabo del mismo modo que con sílica[50,51]. Se comienza con mezclas de cloruro de metileno y hexano (carrier), ajustando la proporción de éstos hasta una retención adecuada y se varía la selectividad reemplazando el primero por metil terc butil eter, THF, MeOH o AcN (acetonitrilo, inmiscible en hexano, puede ser mezclado con FC-113[52]), manteniendo la fuerza del solvente. El cálculo de composición de solventes para mantener el k' en los valores ajustados no es tan simple como en RPLC. Como aproximación, puede interpolarse en un diagrama como el indicado en la figura 5.22. Así por ejemplo, una fase móvil compuesta por cloruro de metileno - hexano (10:90) tendrá una fuerza (0.1) equivalente a AcN 0.3 % en FC113 o a metil-tercbutil eter 0.2 % en hexano.
Es claro que el tipo de interacción entre soluto y fase ligada depende de la naturaleza química del sustituyente de la BP, de modo que el cambio de éste determina un cambio de selectividad.

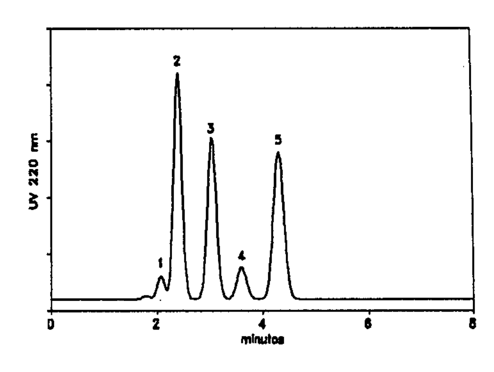
5.5 Aplicaciones

La cromatografía líquida en fase reversa es, como se ha indicado, la modalidad de mayor empleo en HPLC. Los ejemplos presentados a lo largo del capítulo no muestran sin embargo la diversidad de problemas abordables con esta técnica, ya que su única función fue la de apoyar el tema expuesto. En esta sección se reproducen algunos cromatogramas aplicables a disciplinas muy diversas, que si bien podrán ser empleados en casos concretos, sólo se exponen a título informativo y no pretenden abarcar todos los tipos de problemas.
Los siguientes cromatogramas de aplicación fueron cortésmente cedidos por E. Merck para la ilustración de este capítulo.

Acidos Carboxílicos

1. Acido glucónico
2. Acido ascórbico
3. Acido levulínico
4. Acido glutárico
5. Acido oxoglutárico

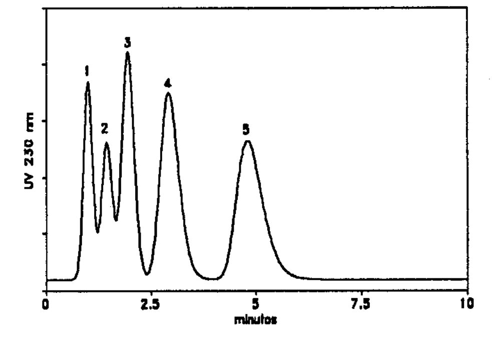
Columna: 125 mm x 4 mm
LiChrosorb RP-18
Eluyente: AcN-buffer 0.05 M, pH 6.5 (5:95) con sulfato de tetrabutilamonio 5 mM.
Caudal: 1 ml/min
Detector: UV 220 nm



Aminas

1. Acido trópico
2. Atropina
3. Diacepam
4. Oximetazolina
5. Perfenacina

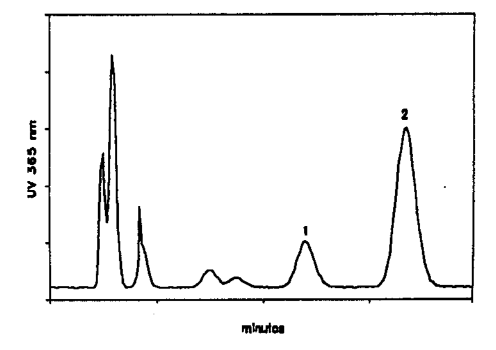
Columna: 125 mm x 3 mm, dp: 7 m
LiChrosorb RP-18
Eluyente: EtOH-agua con octanosulfonato de sodio y H_2SO_4 [500:500 (1.081g+1.5 ml 0.1N)]
Caudal: 1.2 ml/min
Detector: UV 230 nm
Temperatura: 35°C



Aflatoxinas

1. G_2 (0.01 μg)
2. B_2 (0.01 μg)

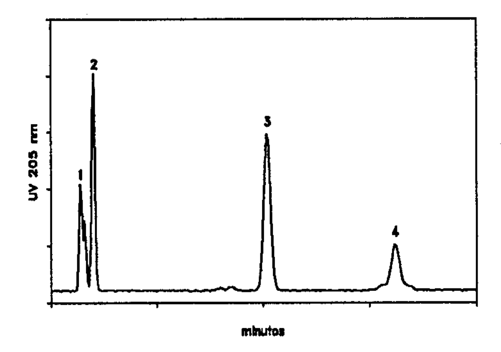
Columna: 125 mm x 4 mm
Superspher 100 RP-18
Eluyente: AcN-MeOH-agua (20:20:60)
Caudal: 1.0 ml/min
Inyección: 10 μl
Detector: UV 365 nm, 0.080 AUFS



Micotoxinas

1. Ocratoxina (1 µg)
2. Vomitoxina (1 µg)
3. Toxina T-2 (1 µg)
4. Zeratoxina (1 µg)

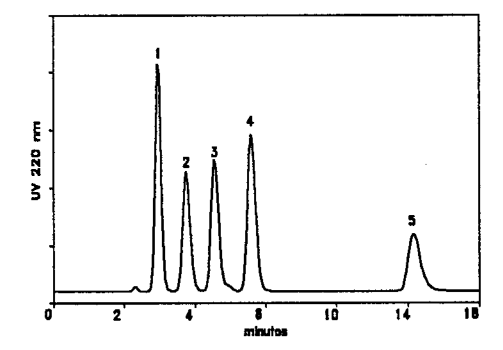
Columna: 125 mm x 4 mm Superspher 100 RP-18
Eluyente: AcN-agua (40:60)
Caudal: 1.5 ml/min
Inyección: 10 µl
Detector: UV 205 nm, 0.160 AUFS



Alcaloides

1. Cafeína
2. Codeína
3. Atropina sulfato
4. Papaverina
5. Eupaverina cloruro

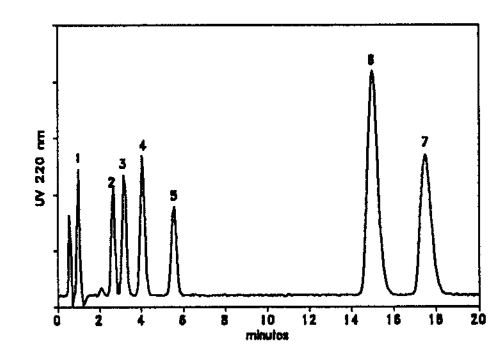
Columna: 250 mm x 4 mm LiChrosorb RP-18
Eluyente: MeOH-KH_2PO_4 50 mM, pH 3.5 (60:40) con octanosulfonato de sodio 40 mM
Caudal: 1.0 ml/min
Detector: UV 220 nm



Alcaloides

1. Sparteinina (2 µg)
2. Hordenina (2 µg)
3. Noscapina (2 µg)
4. Papaverina (2 µg)
5. Atropina (2 µg)
6. Pilocarpina (2 µg)
7. Scopolamina (2 µg)

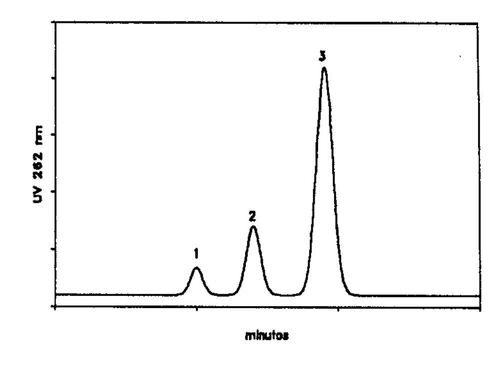
Columna: 250 mm x 4 mm LiChrosorb RP-8
Eluyente: AcN-agua con octilsulfonato de sodio (30:70)
Caudal: 2.5 ml/min
Inyección: 20 µl
Detector: UV 220 nm, 0.080 AUFS



Analgésicos

1. Acido Acetilsalicílico (20 µg)
2. Acetaminofeno (20 µg)
3. Fenacetina (20 µg)

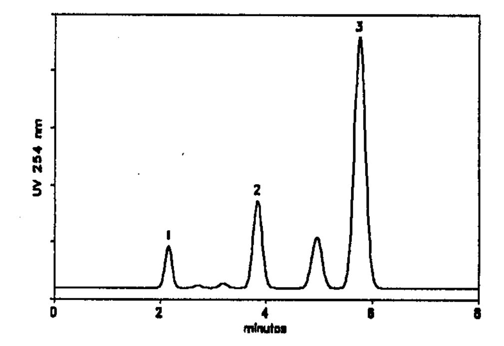
Columna: 250 mm x 4 mm
LiChrosorb RP-8
Eluyente: AcN - agua (50:50)
Caudal: 2.0 ml/min
Inyección: 20 µl
Detector: UV 262 nm, 0.640 AUFS



Anticonvulsivantes

1. Fenobarbital (0.8 µg)
2. Fenitoína (0.8 µg)
3. Carbamazepina (0.8 µg)

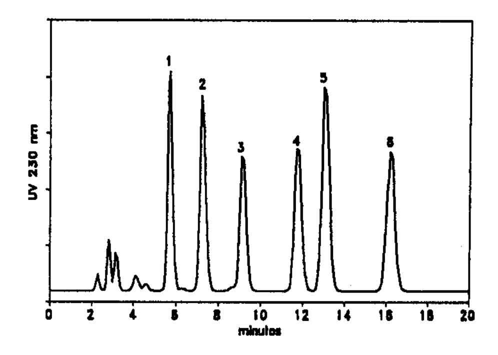
Columna: 250 mm x 4 mm
LiChrosorb RP-18
Eluyente: AcN-agua (50:50)
Caudal: 2.0 ml/min
Inyección: 20 µl
Detector: UV 254 nm, 0.040 AUFS



Barbituratos

1. Barbital (100 µg)
2. Fenobarbital (50 µg)
3. Butabarbital (100 µg)
4. Hexabarbital (100 µg)
5. Amobarbital (100 µg)
6. Secobarbital (100 µg)

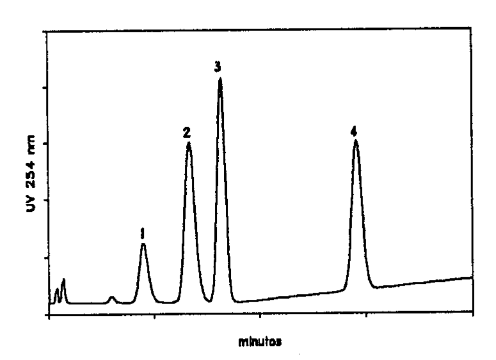
Columna: 250 mm x 4 mm
Superspher 100 RP-18
Eluyente: MeOH-agua (60:40)
Caudal: 0.5 ml/min
Inyección: 25 µl
Detector: UV 230 nm, 0.020 AUFS



Benzodiazepinas

1. Oxazepam (10 µg)
2. Clordiazepóxido (10 µg)
3. N-Desmetildiazepam (10 µg)
4. Diazepam (10 µg)

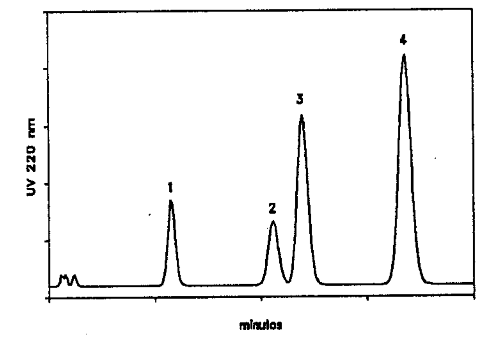
Columna: 250 mm x 4 mm
LiChrospher RP-18
Eluyente: AcN-agua (35:65)
Caudal: 0.7 ml/min
Inyección: 25 µl
Detector: UV 254 nm, 0.040 AUFS



Carbamatos

1. Aldicarb (5 µg)
2. Propoxur (5 µg)
3. Carbofurano (10 µg)
4. Carbaril (2 µg)

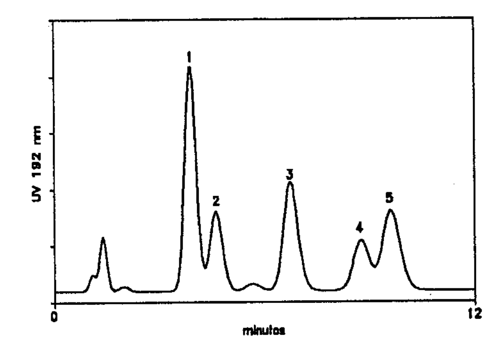
Columna: 125 mm x 4 mm
LiChrosorb RP-18
Eluyente: AcN-agua (20:80)
Caudal: 1.5 ml/min
Inyección: 10 µl
Detector: UV 220 nm, 0.080 AUFS



Carbohidratos

1. Fructosa (31.6 µg)
2. Glucosa (11.2 µg)
3. Sucrosa (25.5 µg)
4. Maltosa (7.9 µg)
5. Lactosa (15.4 µg)

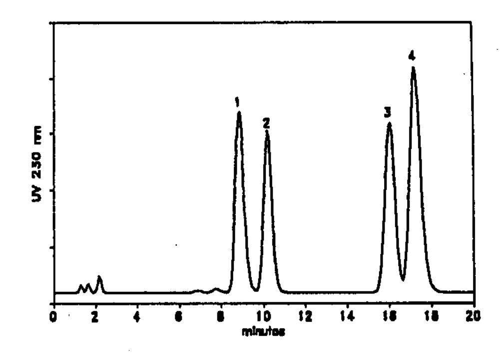
Columna: 250 mm x 4 mm
LiChrospher NH_2
Eluyente: AcN-agua (76:24)
Caudal: 2.0 ml/min
Inyección: 20 µl
Detector: UV 192 nm



Corticosteroides

1. Cortisona (10 μg)
2. Hidrocortisona (10 μg)
3. Corticosterona (10 μg)
4. Acetato de cortisona (10 μg)

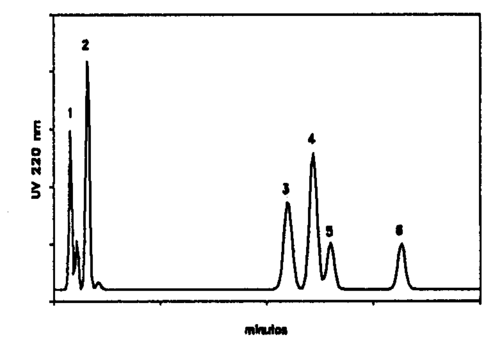
Columna: 250 mm x 4 mm
Superspher 100 RP-18
Eluyente: MeOH-agua (60:40)
Caudal: 0.7 ml/min
Inyección: 10 μl
Detector: UV 230 nm, 0.020 AUFS



Diuréticos

1. Clorotiazida (5 μg)
2. Hidroclorotiazida (5 μg)
3. Ciclotiazida (10 μg)
4. Bendroflumetiazida (5 μg)
5. Impureza
6. Impureza

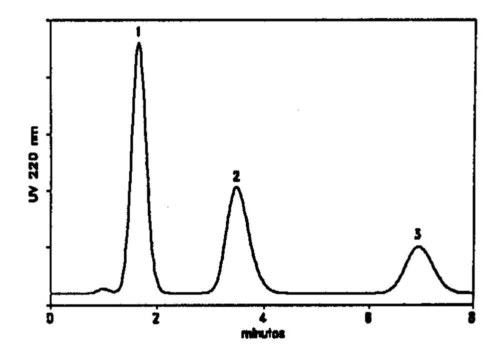
Columna: 125 mm x 4 mm
LiChrosorb RP-18
Eluyente: AcN-agua (30:70)
Caudal: 1.5 ml/min
Inyección: 10 μl
Detector: UV 220 nm, 0.040 AUFS



Glicósidos Cardíacos

1. Esculina (100 μg)
2. g-strofantina (100 μg)
3. Digoxina (100 μg)

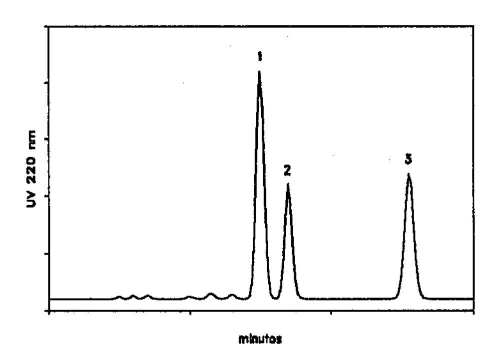
Columna: 250 mm x 4 mm
LiChrosorb RP-8
Eluyente: AcN-agua (40:60)
Caudal: 2.5 ml/min
Inyección: 20 μl
Detector: UV 220 nm, 0.080 AUFS



Pesticidas Organofosforados

1. Metilparatión (10 µg)
2. Malatión (5 µg)
3. Etilparatión (5 µg)

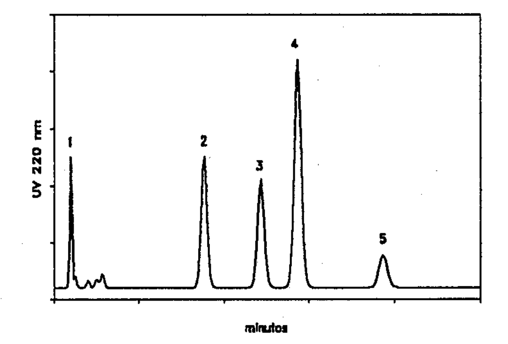
Columna: 125 mm x 4 mm LiChrosorb RP-18
Eluyente: AcN-agua (60:40)
Caudal: 1.5 ml/min
Inyección: 10 µl
Detector: UV 220 nm, 0.040 AUFS



Pesticidas Organoclorados

1. Dieldrin (2 µg)
2. Heptaclor (2 µg)
3. DDT (4 µg)
4. Aldrin (2 µg)
5. Impureza (2 µg)

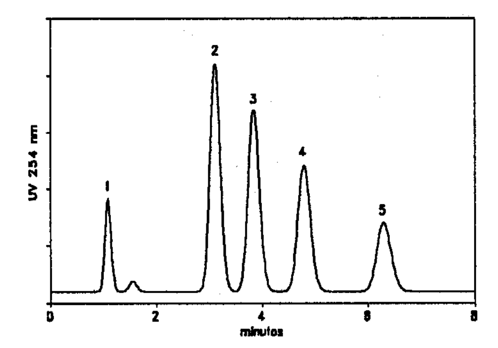
Columna: 125 mm x 4 mm LiChrosorb RP-18
Eluyente: MeOH-agua (80:20)
Caudal: 1.5 ml/min
Inyección: 10 µl
Detector: UV 220 nm, 0.040 AUFS



Conservadores

1. Tartrazina (50 µg)
2. Metilparabeno (50 µg)
3. Etilparabeno (50 µg)
4. Propilparabeno (50 µg)
5. Butilparabeno (50 µg)

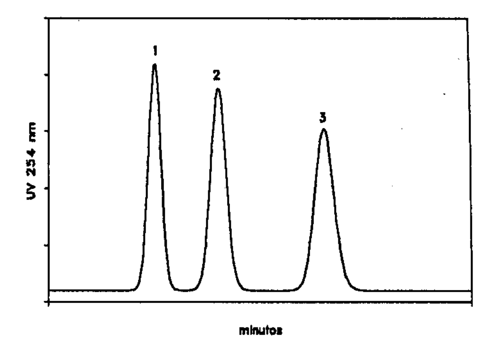
Columna: 250 mm x 4 mm LiChrosorb RP-18
Eluyente: AcN-agua (55:45)
Caudal: 1.0 ml/min
Inyección: 20 µl
Detector: UV 254 nm, 0.640 AUFS



Conservadores

1. Acido p-hidroxibenzoico
2. Acido metil-p-hidroxibenzoico
3. Acido propil-p-hidroxibenzoico
   (10 g de cada uno)

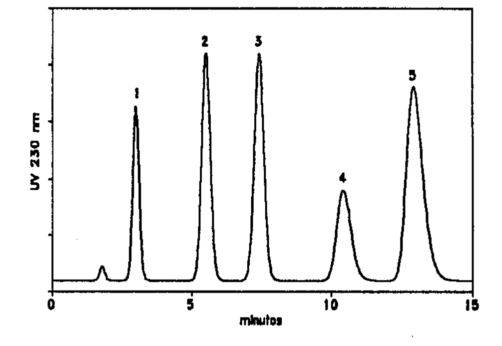
Columna: 125 mm x 4 mm
Superspher 100 RP-18
Eluyente: AcN-agua (50:50)
Caudal: 1.5 ml/min
Inyección: 10 µl
Detector: UV 254 nm, 0.160 AUFS



Conservadores

1. Acido p-hidroxibenzoico
2. Acido benzoico
3. Acido sórbico
4. p-hidroxibenzoato de metilo
5. Acido p-clorobenzoico
   (100 ppm de cada uno)

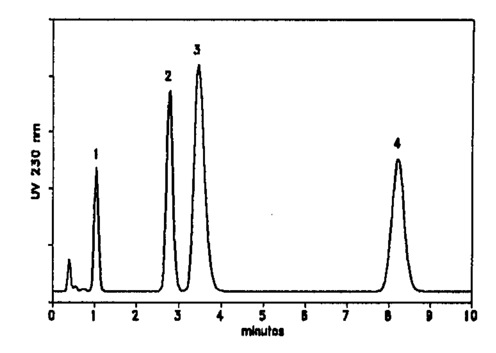
Columna: LiChrosorb RP-18
Eluyente: AcN-buffer acético/acetato pH 4.5 (20:80)
Caudal: 2.0 ml/min
Inyección: 10 µl
Detector: UV 230 nm, 0.160 AUFS



Hormonas

1. Prednisolona	(10 µg)
2. Testosterona	(20 µg)
3. Metiltestosterona	(20 µg)
4. Progesterona	(20 µg)

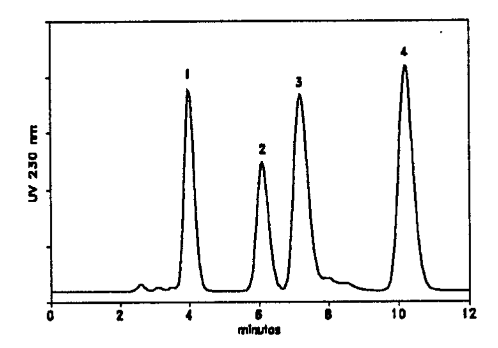
Columna: 125 mm x 4 mm
Superspher 100 RP-18
Eluyente: AcN-agua (50:50)
Caudal: 1.5 ml/min
Inyección: 10 µl
Detector: UV 230 nm, 0.020 AUFS



Sulfonamidas

1. Sulfaguanidina (20 μg)
2. Sulfatiazol (20 μg)
3. Sulfapiridina (10 μg)
4. Sulfametazina (10 μg)

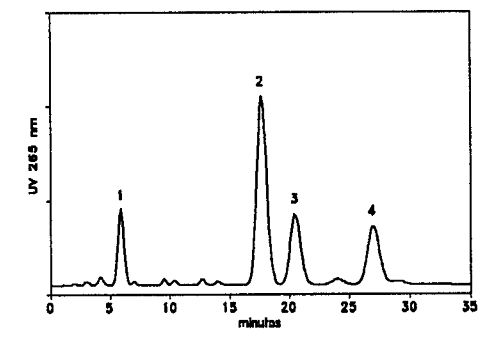
Columna: 250 mm x 4 mm
LiChrosorb RP-18
Eluyente: MeOH-agua (40:60)
Caudal: 0.7 ml/min
Inyección: 10 μl
Detector: UV 230 nm, 0.040 AUFS



Vitaminas

1. Vitamina A
2. Vitamina D_3
3. Vitamina E
4. Vitamina E acetato

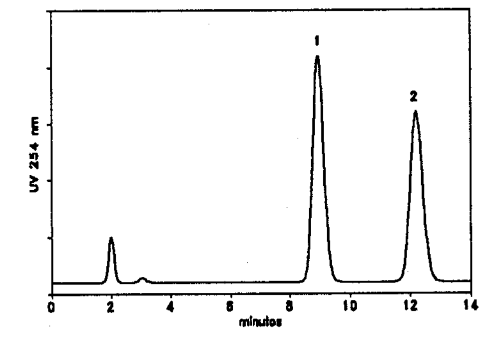
Columna: 250 mm x 4 mm
LiChrosorb RP-18
Eluyente: MeOH-AcN-H_3PO_4 pH 2.8 (48:48:4) con dodecilsulfato de sodio 5 mM
Caudal: 1.2 ml/min
Inyección: 20 μl
Detector: UV 265 nm



Vitaminas

1. Acido D-isoascórbico (137 mg/l)
2. Acido L-ascórbico (125 mg/l)

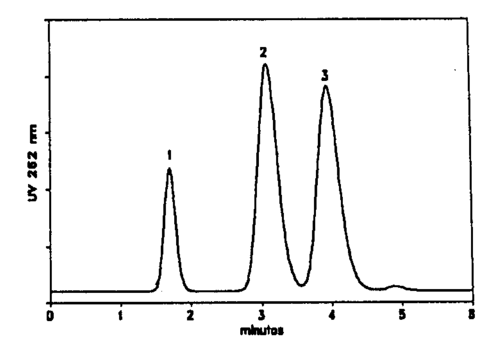
Columna: LiChrosorb NH_2 (10 m)
Eluyente: AcN-buffer (850:150)
(buffer: 0.89 g $Na_2HPO_4.2H_2O$ en 500 ml agua + ác. cítrico 5 % hasta pH 5.5 + agua hasta 1 l).
Caudal: 2.0 ml/min
Inyección: 15 μl
Detector: UV 254 nm, 0.128 AUFS



Vitaminas

1. Nicotinamida
2. Acido ascórbico
3. Acido nicotínico
   (5 mg/100 ml EtOH cada uno)

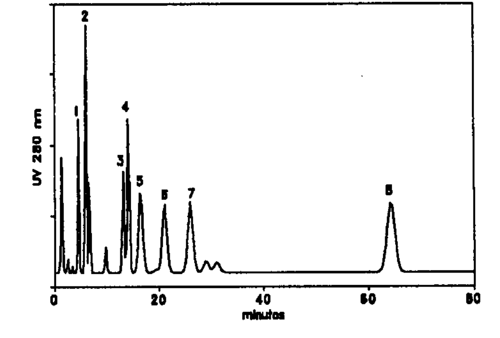
Columna: LiChrosorb RP-18 (10 m)
Eluyente: AcN-bromuro de cetiltrimetilamonio en buffer pH 7.0 (35:65)
Caudal: 2.0 ml/min
Inyección: 10 µl
Detector: UV 262 nm, 0.020 AUFS



Vitaminas

1. Vitamina A
2. Vitamina A acetato
3. Vitamina D_2
4. Vitamina D_3
5. Vitamina E
6. Vitamina E acetato
7. Vitamina K_1
8. Vitamina A palmitato
   (60 a 500 ng cada una)

Columna: LiChrosorb RP-18 (5 m)
Eluyente: MeOH-AcN-agua (12:12:1)
Caudal: 1.0 ml/min
Detector: UV 280 nm, 0.002 AUFS



Referencias

1. Howard G., Martin A., Biochem. J. 46, 532, (1950).
2. Kirkland J., De Stefano J., J. Chromatogr. Sci. 8, 309, (1970).
3. Abel E. y col., J. Chromatogr. 22, 23, (1966).
4. Horváth C. y col., Anal. Chem. 39, 1422, (1967).
5. Majors R., Anal. Chem. 44, 1722, (1972).
6. Unger K., "Packing and Stationary Phases in Chromatographic Techniques", cap.2, M. Dekker, N.Y., 1990.
7. Hearn M., Grego B., J. Chromatogr. 282, 541, (1983).
8. Engelhart E., Anal. Chem. 45, 1149, (1973).
9. Engelhart E., "High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives", vol. 2, cap. 2, Csaba Horváth, Academic Press, N.Y., 1980.
10. Melander W., Horváth C., ibid.,vol. 2, cap. 3.
11. Snyder L.R., Kirkland J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2da. ed., J. Wiley, N.Y., 1979.
12. Unger K. y col., J. Chromatogr. 359, 61, (1986).
13. Danielson N., Kirkland J., Anal. Chem. 59, 2501, (1987).
14. Halász I., Sebastian I., Agnew. Chem. 8, 453, (1969).
15. Colin H., Guichon G., J. Chromatogr. 126, 43, (1976).
16. Grieser M., Pietrzyk D., Anal. Chem. 45 , 1383, (1973).
17. Locke D., Anal. Chem. 44, 90, (1972).
18. Unger K. y col., J. Chromatogr. 125, 115, (1976).
19. Majors R., Hopper M., J. Chromatogr. Sci. 12, 767, (1974).
20. Kinkel J., Unger K., J. Chromatogr. 316, 193, (1984).
21. Kingston G., Gerhard B., J. Chromatogr. 116, 182, (1976).
22. Köhler J., Kirkland J., J. Chromatogr. 385, 125, (1987).
23. Karch K. y col., J. Chromatogr. 122, 76, (1976).
24. Informe Técnico Waters #82352 (D97, Julio 1979).
25. Goldberg A., Anal. Chem. 54, 342, (1982).
26. Wouters I. y col, J. Chromatogr. 291, 59, (1984).
27. Sheinin E., "Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development: An Introduction", parte 5.1, Wainer I, Aster Pub.Co., Washington DC, 1985.
28. Cooke N., Olsen K., Am. Lab., agosto 1979.
29. Snyder L.R., J. Chromatogr. 92, 223, (1978).
30. Snyder L.R., Kirkland J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2da. ed., cap. 6, J. Wiley, N.Y., 1979.
31. Glajch J., Kirkland J., Squire K., J. Chromatogr. 199, 37, (1980).
32. Berendsen G., De Galan L., J. Chromatogr. 196, 21, (1987).

33. Majors R., "High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives", vol. 1, cap. 2, Csaba Horváth, Academic Press, N.Y., 1980.
34. Wehrli A. y col., J. Chromatogr. 149, 199, (1978).
35. Tilly-Mellin A. y col., J. Chromatogr. 149, 331, (1978).
36. Terweij-Groen C. y col., J. Chromatogr. 161, 69, (1978).
37. Bidingmeyer B. y col., J. Chromatogr. 186, 419, (1979).
38. Melander W., Horváth Cs., J. Chromatogr. 201, 211, (1980).
39. Guha O., Janák J., J. Chromatogr. 68, 325, (1972).
40. Schomburg G., Zegarski K., J. Chromatogr. 114, 174, (1975).
41. Houx N., Voerman S., J. Chromatogr. 129, 456, (1976).
42. Fuggerth E., J. Chromatogr. 169, 469, (1979).
43. Heath R., Sonnet P., J. Liquid Chrom. 3, 1129, (1980).
44. Vonach B., Schomburg G., J. Chromatogr. 149, 417, (1978).
45. Chow F., Grushka E., Anal. Chem. 49, 1756, (1977).
46. Cooke N. y col., J. Chromatogr. 149, 391, (1978).
47. Quattrocchi O., Pomies D., Capasso A., SAFYBI 29,2754, (1989).
48. Horváth Cs., Melander W., J. Chromatogr. 125, 129, (1976).
49. Horváth Cs., Melander W., Molnar I., Anal. Chem. 49, 142, (1977).
50. Weiser E. y col., J. Chromatogr. 303, 1, (1984).
51. Snyder L., Glajch J., Kirkland J., "Practical HPLC Method Development", J. Wiley, N.Y., (1988).
52. Glajch J. y col., Anal. Chem., 54, 1276, (1982).
53. Pietta P., J. Chromatogr. 390, 454, (1987).
54. Abelaira S. y col., V Congreso de Farmacia y Bioquímica Industrial, Buenos Aires, 1990.
55. Abelaira S. y col., III Congreso de Farmacia y Bioquímica Industrial, Buenos Aires, 1984.
56. Little C., Dale D., J. Chromatogr. 153, 543, (1978).

Capítulo 6

Cromatografía en Fase Normal

6.1 Introducción

La cromatografía líquido-sólido (LSC) o cromatografía de adsorción es la modalidad cromatográfica más antigua. Sus orígenes se remontan a los trabajos del botánico Tswett[1] en 1903, y publicados en 1906, en los cuales separó una serie de pigmentos vegetales en columnas de vidrio rellenas con un adsorbente finamente dividido, carbonato de calcio, percolando éter de petróleo. Tswett propuso que las moléculas de soluto se adsorbían al material de relleno, y que los componentes más fuertemente adsorbidos se desorbían con dificultad, descendiendo más lentamente de la columna. Por su parte, los componentes adsorbidos con menor intensidad eran transportados a mayor velocidad, y la separación se lograba a causa de la diferencia de afinidad de los solutos entre el solvente (hoy llamado fase móvil) y el relleno (hoy la fase estacionaria). El período de mayor actividad de Tsweet concluyó alrededor de 1912, luego del cual muy pocos investigadores emplearon esta técnica. Sin embargo, en 1930 Edgar Lederer encontró y aplicó nuevamente los trabajos de Tsweet, y a partir de sus publicaciones renació la técnica cuyo crecimiento hasta la fecha fue exponencial. La cromatografía de adsorción fue la modalidad empleada prácticamente con exclusividad, hasta que Howard y Martin[2] encontraron un problema de difícil resolución debido a la polaridad de la fase móvil: la separación de ácidos grasos de cadena larga. El problema fue resuelto tratando silicagel de baja actividad con vapores de diclorodimetilsilano para obtener una fase estacionaria hidrófoba, no polar. Se pudo así utilizar mezclas hidroalcohólicas (de naturaleza polar) como fase móvil, marcando el nacimiento de la fase reversa. Sin embargo, la modalidad predominante siguió empleando rellenos de alta polaridad y solventes no polares hasta comienzos de la década del '70, en la cual la fase reversa comenzó su crecimiento gracias al desarrollo de un material pelicular de fase reversa, llamado comercialmente Permanase ODS.

Dada la profunda variación entre ambas modalidades, la tradicional que empleaba una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar fue llamada **normal o NP** (por normal phase), y la nueva, con fase estacionaria no polar y fase móvil polar, **reversa o RP** (por reversed phase). Con el tiempo la cromatografía de fase normal o de adsorción fue siendo desplazada por la de fase reversa por versatilidad, sencillez y por el empleo de solventes más baratos y menos peligrosos (agua, metanol, acetonitrilo) que los solventes no polares. Sin embargo, la selectividad de la cromatografía en fase normal es única, y probablemente no llegue a ser desplazada por completo por ninguna otra modalidad. En todo caso, ninguna de las formas cromatográficas debe ser considerada como el único camino, sino como una simple herramienta que puede ser cambiada por otra más apropiada cuando el problema lo requiera.

La cromatografía en fase normal se realiza sobre fases estacionarias hidrofílicas como la sílice o alúmina microporosas y con solventes de mediana a baja polaridad como fase móvil. Es un método apropiado para la separación de solutos de polaridad mediana a alta y es de suma utilidad para la separación de isómeros posicionales con sustituyentes

polares. De hecho, es importante aclarar que la cromatografía en fase normal es el único modo de HPLC que puede separar eficientemente isómeros posicionales con sustituyentes polares. Por el contrario, la cromatografía en fase normal resulta ser poco apropiada para la separación de homólogos o sustancias cuyas diferencias estructurales se encuentren en la zona no polar de la molécula (separación muy fácil de lograr en fase reversa). El mayor inconveniente de NP se debe a la alta actividad del material de relleno, que tiende a absorber agua y solventes polares en su superficie. Como consecuencia, su comportamiendo puede modificarse en detrimento de la reproducibilidad de resultados.

6.2 Materiales de relleno

La cromatografía en fase normal puede efectuarse sobre partículas totalmente porosas de sílice, alúmina o materiales de fase ligada cuyo comportamiento, según la naturaleza de la fase móvil, responde a esta modalidad. Es decir, dado que la polaridad de los rellenos de fase ligada no es tan alta como la de la silicagel o la de la alúmina, es posible utilizar, por ejemplo con una columna de grupos ciano fases móviles de polaridad menor al del grupo CN con lo cual el comportamiento será el de la fase normal, o fases móviles de mayor polaridad que el grupo CN, resultando en fase reversa. La funcionalidad de los rellenos de fase ligada utilizados para fase normal pueden responder a grupos ciano, diol, nitro y amino, y tanto sus propiedades generales como sus vías de síntesis fueron tratados en el capítulo 5.
A continuación describiremos brevemente las propiedades más relevantes de los materiales de base sílica y alúmina, aunque el lector interesado puede recurrir a literatura específica[7].

Sílice

La sílice microporosa es, sin lugar a dudas, el material de relleno preferido por los analistas para las separaciones en fase normal. Es un material de alto poder de adsorción, amorfo, de composición ($SiO_2.H_2O$) que se utiliza en forma de xerogel de área superficial muy elevada (30 a 550 m^2/g), con tamaños de poro de 60 a 300 Å y volúmenes de poro de 0.8 a 1.2 ml/g. La tabla 5.11 resume algunas características de materiales comerciales y la figura 5.3 ilustra la diferencia de comportamiento de estos materiales en función del tamaño de poro. Es claro que el área superficial de la sílice está estrechamente vinculado al tamaño de poro, y que la retención lo está con el área superficial. Así, a menor tamaño de poro corresponde mayor área superficial y por ende, mayor retención del analito. Sin embargo, como el diámetro del poro se relaciona también con los fenómenos de exclusión por tamaño[3,4], no se emplean materiales de diámetro de poro menor a 60 Å ya que se ha

observado aún moléculas pequeñas tienen acceso restringido a poros más chicos.
El tamaño y la morfología de las partículas puede variar, pudiendo optarse por materiales de relleno esféricos o irregulares, con tamaños de partícula desde 3 hasta 10 µm, siendo los más utilizados los de 5 y 10 µm.
Se admite que, en esta modalidad cromatográfica, el proceso de adsorción del analito está gobernado por los grupos hidroxilo (silanol Si-OH) presentes en la superficie de la sílice[5]. Existen tres tipos diferentes de grupos silanol: vecinal, geminal y aislado que interactúan con el analito por medio de enlaces de hidrógeno.

Silanol vecinal	Silanol geminal	Silanol aislado
OH OH / | | / -Si-O-Si-	HO OH / \ / / - Si -	OH / | / - Si -

La retención del analito depende de la concentración de grupos silanol por unidad área superficial del material de relleno, cantidad variable según el tipo de sílice empleado, del método de obtención del material, de las condiciones de elaboración, y de las condiciones de almacenamiento. Es así comprensible que las propiedades de las diversas sílices comerciales varíen de fabricante en fabricante y aún entre distintos lotes de un mismo fabricante, debido a las diferentes condiciones de elaboración o a las variables del proceso, aunque la variación es menor que la observada en los materiales de fase ligada.
La presencia de agua en este tipo de material es muy importante ya que influye mucho en la retención de los solutos. El agua puede existir en la sílice de dos modos diferentes: como humedad adsorbida a los grupos activos o como agua de constitución, formando parte del material (definimos químicamente la sílice como un óxido de silicio hidratado). La primera de ellas se elimina a temperaturas de hasta 150°C, pero a temperaturas mayores a 200°C comienza la condensación de los grupos silanol, que se deshidratan formando uniones siloxano. Por encima de 600°C todo el agua se pierde y todos los grupos silanol se condensan para formar uniones siloxano.
Cuando se hidrata la silicagel, el agua adsorbida físicamente forma multicapas que van llenando los poros de las partículas. Cuando los poros están totalmente llenos de agua, la retención de los solutos ya no obedece a fenómenos de adsorción, sino a mecanismos de partición entre la fase móvil y el agua adsorbida en la superficie del material de relleno, que desde entonces deja de ser la fase estacionaria para convertirse en un simple soporte de la verdadera fase estacionaria, el agua.
Por otra parte, la presencia de grupos silanol superficiales confieren a la sílice las características propias de los ácidos débiles. Por ese motivo los analitos de carácter básico serán retenidos más fuertemente que los que posean características neutras o ácidas. Los analitos ionizables suelen eluir muy lentamente y con un tailing pronunciado. En estos casos, la cromatografía puede mejorarse con el agregado de TEA (o de aminas en general)

a la fase móvil para la determinación de analitos básicos, y ácido acético (o de ácidos orgánicos en general) para los analitos ácidos. Si el tailing se debe a interacciones con los grupos silanol de fuerte adsorción, también es posible mejorar la separación inactivándolos. A tal efecto, el agregado de **pequeñas proporciones** de alcoholes (metanol, isopropanol) o de agua a la fase móvil, tiene el efecto de neutralizar a los grupos muy activos y, por ende, mejorar el cromatograma. El agregado de agua puede además ser importante en otros casos. Es conocido que la presencia de trazas de agua en materiales no modificados de NP produce efectos dramáticos en la retención de los solutos (ver figura 5.7). Utilizando solventes no polares anhidros es posible que por efecto de la propia humedad ambiental se produzcan variaciones muy importantes en los tiempos de retención. En este caso es recomendable saturar los solventes a utilizar con agua, o bien agregar un modificador polar a la fase móvil (metanol, isopropanol). Es también posible disminuir la inhomogeneidad de la superficie regulando su carácter ácido con el agregado de buffers para acondicionar la columna y estandardizar su comportamiento[6]. En todo caso, debe tenerse en cuenta que la sílicagel es insoluble en los solventes no polares habituales en NP, pero es ligeramente soluble en agua, y que la solubilidad en agua aumenta cuando el pH es superior a 7.5.

Alúmina

La alúmina es un óxido de aluminio hidratado de fórmula $Al_2O_3.nH_2O$, donde n toma valores entre 0 y 3. La alúmina cromatográficamente activa contiene γ-alúmina como componente mayoritario y otros óxidos de aluminio denominadas alúminas de transición[7]. Esta γ-alúmina se obtiene por descomposición térmica de la gibbsita o boehmita AlO(OH) a temperaturas comprendidas entre 400 y 700 °C. La alúmina así obtenida presenta una superficie específica de 50 a 200 m^2/g, con un volumen de poro de hasta 0.6 ml/g. El diámetro medio de poro es de 100 a 200 Å y la concentración de grupos hidroxilados está en el orden de los 3 μmoles/m^2.

Una suspensión de alúmina en agua puede presentar un pH cercano a 9. Esta alcalinidad se debe a la presencia de sodio, que se encuentra como óxido y como aluminato de sodio[7]. Así, esta alúmina llamada "básica" puede ser empleada como intercambiador catiónico (ver sección 7.2). Su neutralización y acidificación hace incluso posible su empleo como intercambiador aniónico. Este carácter anfotérico de la alúmina permite la determinación de solutos de carácter ácido y básico, pero deben evitarse los pHs extremos, que pueden llevar a la disolución de la fase estacionaria.

La superficie activa de la γ-alúmina presenta los mismos inconvenientes que la sílice respecto del agua adsorbida. Por este motivo deben tenerse en cuenta las mismas consideraciones descritas para la sílice, aunque las propiedades ácidas y básicas débiles de la γ-alúmina le confieren algunas interacciones adicionales que deben tenerse en cuenta.

También como con la silicagel, la retención obedece a mecanismos basados en enlaces de hidrógeno, con la posibilidad adicional de que los solutos interactúen con una sustancia muy rica en electrones. A diferencia de la sílice, que pierde actividad[6] al ser calentado por encima de los 200 °C, a mayor temperatura de tratamiento de la alúmina, al menos hasta 700 °C, corresponde mayor poder de retención.
La γ-alúmina es útil para la separación de sustancias orgánicas no saturadas, anillos bencénicos e isómeros de anillos aromáticos condensados.

6.3 Fase móvil

La elección de la fase móvil juega, como en toda modalidad cromatográfica, un rol fundamental. Como se ha indicado, en cromatografía de fase normal la fase estacionaria es polar y la fase móvil no polar.

Fuerza de los solventes

Snyder[5] ha clasificado empíricamente los solventes empleados en cromatografía en orden creciente de fuerza de elución ($\varepsilon°$) y definió esa fuerza de elución como la "energía de adsorción del solvente por unidad de área". La fuerza de un solvente (ver tabla 6.I) está relacionada con su polaridad, y permite controlar el valor de k' de los diferentes analitos de una muestra. Los valores de $\varepsilon°$ indicados para los distintos solventes fueron obtenidos sobre alúmina en base a volúmenes de retención de muestras estándar. Estos volúmenes de retención fueron luego relacionados con los de n-pentano, cuya fuerza de elución se hizo arbitrariamente igual a cero. Los primeros miembros de la serie poseen un valor muy bajo de fuerza de elución, es decir, producen largos tiempos de retención. Los últimos miembros de la serie son por el contrario los que poseen mayor fuerza de elución, es decir, son los más polares y los que producen la elución más rápida.
En NP se utilizan normalmente mezclas de dos solventes. Podemos denominar A al solvente que presenta baja fuerza de elución (bajo valor de $\varepsilon°$) y B al de mayor fuerza de elución (alto valor de $\varepsilon°$). Así, variando las proporciones relativas de estos solventes entre 0 y 100 es posible obtener una amplia gama de valores de $\varepsilon°$ que conducirán a la obtención de diferentes valores de k'. Entonces, para determinar la composición apropiada de solventes en una separación dada basta con mezclar dos componentes en distintas proporciones hasta obtener los valores de k' deseados. Para ello es posible mezclar solventes que contengan dos valores de $\varepsilon°$ muy próximos o muy separados. A pesar del hecho de que la fuerza de elución no varía linealmente con el porcentaje de los solventes individuales en las mezclas, es posible asumir la linealidad siempre y cuando los

Solventes	Fuerza de Elución ε°		Constante Dieléctrica (Debye)
	Alúmina	Sílica	
n-Pentano	0.00	0.00	1.84
n-Hexano	0.01	0.01	1.88
n-Heptano	0.01	0.01	1.92
Eter Etílico	0.38	0.38	4.33
Cloroformo	0.40	0.26	4.8
Cloruro de Metileno	0.42	0.32	8.93
Tetrahidrofurano	0.45	---	7.58
Diclorometano	0.49	---	10.7
Dioxano	0.56	0.49	2.21
Acetato de Etilo	0.58	0.38	6.11
Acetonitrilo	0.65	0.5	37.5
n-Propanol	0.82	---	21.8
Etanol	0.88	---	25.8
Metanol	0.95	---	33.6

Tabla 6.I Serie Eluotrópica según Snyder[5], de algunos solventes utilizados en NP.

solventes no difieran entre sí en más de 0.2 unidades en sus valores de ε°. Cuando se realizan las mezclas es conveniente tener en cuenta que un incremento en la fuerza de solvente de unas 0.05 unidades disminuye el valor de k' en unas 3 ó 4 unidades[8].

Modificadores

Se reconoce en la silicagel la presencia de grupos silanol de distinta actividad, y que los grupos más activos, con alto poder de adsorción, son capaces de inducir muchos de los problemas más comunes de la cromatografía en fase normal (ver sección 13.3). Este inconveniente se hace muy manifiesto si se opera con solventes supuestamente anhidros y sin modificadores polares, especialmente en el casos de los hidrocarburos alifáticos en los que el agua es muy poco soluble (no más que 200 ppm). A menos que estos solventes se sequen y almacenen en condiciones extremadamente rigurosas, sus contenidos de agua son muy dispares, y el comportamiento cromatográfico varía profundamente. En este caso el agua contenida en el solvente, aún a nivel de trazas, se va concentrando en la columna a medida que la fluye fase móvil.

Los modificadores pueden definirse como sustancias de alta fuerza de elución que se agregan a la fase móvil en pequeña proporción. Modifican sustancialmente el comportamiento de la superficie porque se adsorben (por su mayor polaridad) sobre los sitios de

fuerte retención, causantes de las irregularidades en el comportamiento de la sílice, dejando libre para la retención una superficie de poder de adsorción homogéneo. Dicho de otro modo, la función de estos modificadores consiste en "desactivar" los sitios de alta reactividad de la sílice.
El principal modificador y el más usado es el agua y su concentración depende de su solubilidad en el solvente elegido para la separación. Las ventajas de la utilización de agua como modificador de las separaciones en fase normal ha sido resumida por Snyder y Kirland[9], en las siguientes características:

- Menor variación en la retención de los analitos entre muestra y muestra.
- Aumento sustancial en la capacidad de carga de la columna, con isotermas lineales de distribución.
- Mayor eficiencia y menor tailing (en algunos casos).
- Compensación parcial de las diferencias entre lotes de relleno de un mismo fabricante.
- Reducción de la tendencia del adsorbente a catalizar las reacciones de los analitos durante la separación.

Sin embargo, la cantidad de agua que necesita agregarse para obtener estos beneficios no es fácil de calcular y depende de su nivel de saturación en la fase móvil. Habitualmente se utiliza solvente saturado en agua mezclado al 50 ó 75 % con el mismo solvente seço. Snyder[10] recomienda el uso de solventes con igual nivel de saturación de agua (50 % para columnas de sílice y 25 % para columnas de alúmina) llamados **"solventes isohídricos"** siempre que el valor de ε° sea mayor que 0.1. De esta forma se logra una buena cobertura de la superficie adsorbente y la reducción del tiempo de equilibrio de la columna al cambiar el solvente. La obtención de los solventes isohídricos (al 50 % de saturación) se puede lograr fraccionando el mismo en dos volúmenes iguales. Una de las fracciones se seca, por ejemplo por tratamiento con tamices moleculares de 4 Å (ver sección 4.4), y la fracción restante se satura con agua por agitación enérgica. Este proceso de saturación puede necesitar varias horas porque no todos los solventes alcanzan en forma rápida el equilibrio con el agua, como es el caso de los hidrocarburos alifáticos. Finalmente, el solvente seco y el saturado en agua se mezclan en volúmenes iguales. Los solventes isohídricos pueden utilizarse en la modalidad isocrática pero no con gradientes de elución ya que la solubilidad del agua puede variar al cambiar la composición de la fase móvil (en la cual cada solvente individual está parcialmente saturado). De intentarse, el agua puede separar de la fase móvil, que perdería homogeneidad dentro de la columna.
Una mayor proporción de agua en la fase móvil puede conducir al bloqueo total de los grupos silanol superficiales y consecuentemente, a la pérdida de retención debida a adsorción. En ese caso particular donde todos los poros se encuentran llenos de agua, la separación obedece a particiones líquido-líquido.
También se emplean otros modificadores[8] que presentan menores problemas que el agua: alcoholes (metanol, etanol, isopropanol), acetonitrilo y tetrahidrofurano. Estos modifica-

dores, también llamados moduladores, se agregan en proporción variable entre 0.05 y 0.5 % a la fase móvil.
Debe sin embargo tenerse en cuenta que el empleo de un modificador, sea agua u otro agente, modifica tanto la fuerza de elución y como la selectividad de la separación.

6.4 Mecanismo de la separación

La adsorción puede interpretarse como una concentración de un analito en una columna cromatográfica respecto del solvente en el que está fluyendo. Ese enriquecimiento surge las interacciones existentes entre los analitos y el material de relleno de la columna. La retención se debe a la competencia que se establece entre:

Fase móvil - Superficie Adsorbente
Analito - Superficie Adsorbente

Si las fuerzas de interacción de la fase estacionaria con el analito son débiles, éste será poco retenido y eluirá cerca de o en el volumen muerto del sistema. En cambio, si la interacción es muy fuerte su elución se verá retardada e incluso puede quedar retenido en la fase estacionaria, sin eluir del sistema.
El proceso de adsorción de los analitos sobre una fase estacionaria polar como la sílice o la alúmina está gobernado por interacciones específicas[11] entre los grupos polares de la superficie adsorbente y los del analito. Las más representativas son:

- Interacción dipolo-dipolo, ya sea entre moléculas de momento dipolar permanente o entre dipolos inducidos.
- Interacción por puente hidrógeno.
- Mecanismos de transferencia de carga.
- Formación de complejo π.

Como toda otra técnica cromatográfica, la cromatografía en fase normal posee un rango lineal de trabajo en el cual se mantienen constantes los valores de tiempo de retención, los factores de capacidad y la separación, con independencia de la masa de analito inyectado[5]. Este rango lineal se puede ampliar por el agregado a la fase móvil de ciertas sustancias, denominadas **modificadores** (agua, THF, AcN, y alcoholes como metanol, etanol, isopropanol) que actúan como neutralizadores de los sitios de alta reactividad de la fase estacionaria. Estos silanoles poseen diferente capacidad de adsorción y reducen la linealidad de respuesta[8].
En 1940 Trappe[12] dispuso los solventes en orden creciente de sus constantes dieléctricas (es decir, los menores tiempos de retención son obtenidos con los últimos miembros de

la serie). Este ordenamiento se denominó **"serie eluotrópica"**. Años más tarde se reconoció la importancia de la polaridad sobre la fuerza de elución del solvente, lo cual llevó a Snyder[5] a establecer otra serie eluotrópica, esta vez en función de la fuerza de elución (ver sección 6.3). Esta serie, utilizada para optimizar la separación cromatográfica, difiere muy poco de la original de Trappe. Las diferencias pueden deberse a interacciones selectivas o específicas entre los solventes individuales, los adsorbentes y los solutos empleados para establecer la serie[8].

En la década siguiente se desarrollaron varias teorías que intentaban explicar el proceso de separación cromatográfico en NP, la primera de las cuales se debe a Snyder[5]. Años después Soczewinski[13] presentó un modelo que representa una simplificación del original[14] de Snyder y hoy, este modelo llamado de **desplazamiento o de competición** se atribuye a Snyder-Soczewinski. Años más tarde Scott y Kucera[15-18] expusieron el modelo llamado de **intercambio de solvente.**

Modelo de Snyder-Soczewinski

Se denomina de "desplazamiento" porque se basa en las siguientes suposiciones:

- Que las moléculas del analito en solución compiten dentro de la columna con las moléculas del solvente por los sitios activos del adsorbente que posee características polares.
- Que la superficie del adsorbente se halla totalmente cubierta por las moléculas del solvente en forma de monocapa.
- Que la superficie adsorbente es totalmente homogénea, lo que implica que la actividad de la superficie adsorbente no cambia con las condiciones experimentales de trabajo.
- Las interacciones entre las moléculas del solvente y/o del analito en solución son canceladas por las correspondientes en la fase estacionaria.

El modelo de Snyder establece diferentes tipos de interacción entre el soluto y la superficie adsorbente:

- **Desplazamiento sin localización.** La molécula del analito desplaza un volumen igual de solvente adsorbido, en forma de monocapa, en la superficie sin preferencia por lugares específicos de dicha superficie. Esto funciona bien cuando es aplicado en LSC para solventes y analitos de baja polaridad.
- **Deslocalización por acceso restringido.** Al aumentar la polaridad de las moléculas del solvente como las del analito, este modelo comienza a fallar ya que estas moléculas interactúan más fuertemente con la superficie adsorbente en los sitios activos. Al ir aumentando la concentración de B (solvente polar) interactúa con esos sitios hasta llegar a una concentración en la que la adsorción localizada no tiene lugar y que se atribuye a interferencias entre las moléculas de B, siendo las energías de adsorción de las moléculas[19] en estas posiciones especificas mayores que para las moléculas

adsorbidas no localizadas y hacen que el modelo de desplazamiento resulte más complejo.

- **Deslocalización por competición por el sitio activo.** Tiene lugar cuando las moléculas del solvente o del analito están adsorbidas adyacentes a otras moléculas de las mismas en forma localizada.
- **Deslocalización intramolecular.** Tiene lugar con moléculas de analito o de solvente que poseen más de un grupo funcional que puede interactuar con la superficie adsorbente y si uno de ellos es más fuerte que los demás, la molécula interactúa con la superficie a través de este grupo.

Modelo de Scott-Kucera

Es aplicable a solventes polares no-anfotéricos (son aquellos que en estado puro no pueden desarrollar uniones hidrógeno) como el THF, AcN, acetato de etilo, metil etil cetona.

Supone que luego de un tratamiento térmico de la sílice a 150 °C o por pasaje de un solvente anhidro, dejará una monocapa de agua adsorbida en la superficie de la sílice a la que se halla unida por medio de uniones hidrógeno, y que cuando se pone en equilibrio con un solvente no-polar éste formará una monocapa (la segunda), luego las moléculas del analito interactuarán incorporándose a esta segunda monocapa. A este proceso Scott y Kucera lo definen como **"sorción"** por medio de fuerzas dispersivas.

Postulan para las moléculas de analito las siguientes interacciones:

- en el caso de usar un solvente de baja polaridad, las moléculas del soluto desplazan a las del solvente e interactúan con los grupos hidroxilos hidratados de la superficie.
- si las moléculas del analito son muy polares, más que las del solvente polar, cuando se está por lograr la cobertura de la monocapa de la superficie, tienen lugar fenómenos de asociación y de desplazamiento.
- para moléculas de analito muy polares, se asocian con las del solvente y forman una fase estacionaria.

Snyder y Poppe[19] han realizado un estudio comparativo de ambos modelos, y concluyen que el modelo de propuesto por Scott-Kucera posee varios puntos objetables, uno de ellos es que la densidad de grupos hidroxilo en una sílice térmicamente tratada es de 8-9 μmoles/m^2 (ver sección 5.2) y no de 2.5 μmoles/m^2 como es propuesto por Scott-Kucera. Por otro lado, el modelo de Snyder (de desplazamiento), no posee restricciones en el campo de aplicación, tanto de solvente como de superficie adsorbente, ya que se lo ha utilizado para explicar el proceso de separación cromatográfica en fase normal, fase ligada e incluso en el campo de la GC. Numerosas publicaciones de trabajos de investigación ha aportado datos experimentales para sustentar el mismo.

6.5 Desarrollo de métodos

Las estadísticas indican que la modalidad cromatográfica más empleada es la fase reversa. La RPLC es evidentemente la modalidad más versátil y si exceptuamos la cromatografía de exclusión, de aplicación muy particular y restringida, es la más sencilla y predecible. Los solventes de RPLC son más económicos y menos riesgosos, los tiempos de equilibrio entre columna y fase móvil son menores, el gradiente de elución no presenta dificultades, etc. Sin embargo, la gran diferencia de selectividad que provee la fase normal la convierte en una herramienta válida y en muchos casos única cuando la resolución en fase reversa es insuficiente.

Hasta antes del desarrollo de materiales de fase ligada, la cromatografía en fase normal se realizaba en materiales no modificados, sílica en primer término, bastante menos en alúmina, y muy poco en otros materiales (florisil, celite, poliamidas, tierra de diatomeas). La gran higroscopicidad de estos materiales y las dificultades en la manipulación de solventes secos o "semihúmedos" alejaron al cromatografista de este método, en el cual el gradiente de elución es muy difícil, y aún en la modalidad isocrática, los resultados son poco reproducibles.

Afortunadamente, los materiales de fase ligada para NP (ciano, diol, amino) resultaron buenos sustitutos para la sílica, y son los materiales de primer elección para el desarrollo de métodos. El material no modificado mantiene sin embargo virtudes (léase selectividad) que no pueden alcanzar los de fase ligada, pero deberían dejarse como última alternativa de desarrollo.

Establecidas las condiciones preliminares (objetivos, tipo y concentración del analito, solvente de disolución de la muestra, tipo de detector, etc.), parámetros que se detallan el capítulo 11, deberá escogerse el sistema cromatográfico adecuado, es decir, la combinación columna-fase móvil que produzca la separación requerida.

El primer paso en el desarrollo consiste en obtener una fase móvil que provea un rango de k' adecuado, por ejemplo, entre 2 y 10 para muestras sencillas o entre 0.5 y 20 para muestras complejas, con muchos componentes. La primer elección podría consistir en la combinación de una columna de polaridad media, de fase ligada a grupo ciano, y un solvente puro de fuerza media, por ejemplo cloruro de metileno. Una inyección de la muestra en este sistema dará lugar, si somos muy afortunados, en primer lugar a una elución apropiada (en el rango de k') y en segundo lugar a una adecuada separación de los constituyentes de la muestra. Sin embargo, es muy probable que ambas cosas deban ajustarse. La fuerza de elución se ajusta en función del k' experimental. Si la muestra queda muy retenida, puede agregarse acetonitrilo o metanol en fracciones de 10 % o menores a medida que nos acerquemos al rango deseado. Si la muestra eluye cerca del volumen muerto, deber agregarse un solvente de menor fuerza, por ejemplo hexano, isooctano, o FC-113 (recomendado por Glajch y col.[20]). En este caso resulta conveniente agregar una proporción considerable del solvente más débil, por ejemplo 50 %, aumen-

tando aún más o bien reduciendo progresivamente esta proporción hasta el rango deseado de k'.

Independientemente de la fuerza de elución, la aparición de picos asimétricos puede corregirse por agregado de 0.1 % de trietilamina o de ácido acético según la naturaleza de la muestra.

Ajustado el rango de k', deberá evaluarse si la resolución es apropiada. De no ser así, se reemplaza la fase móvil dominante (cloruro de metileno, ya que el hexano o el isooctano al igual que el agua en fase reversa funcionan como carriers, sin aportar selectividad a la separación) por otro solvente. Este solvente se escoge de modo de asegurar un cambio efectivo de selectividad.

Puede intentarse, manteniendo la fuerza de elución:

- reemplazar el cloruro de metileno por acetonitrilo
- reemplazar el cloruro de metileno por metanol
- reemplazar el cloruro de metileno por metil tercbutil éter

Finalmente, si ninguna de las fases móviles ensayadas da por resultado la resolución pretendida, pero más de una resuelve algún sector del cromatograma, es posible ensayar la mezcla 1:1 de dos de las más promisorias, o hasta 1:1:1 de tres de ellas. Este tratamiento, bastante empírico, puede resultar suficiente en muchos casos. Los problemas más complejos probablemente necesiten otro enfoque. Puede intentarse fraccionar los componentes de la muestra por algún proceso separativo previo, o bien recurrir a mapas de resolución como el comentado en el capítulo 11.

6.6 Aplicaciones

A continuación se reproducen algunos cromatogramas de aplicaciones de esta modalidad cromatográfica, tan sólo a modo informativo, y que fueran gentilmente cedidos por la firma E. Merck.

Vitamina D_2

1. Provitamina D 1.0 µg
2. Lumisterol 1.0 µg
3. Vitamina D_2 10.0 µg
4. Ergosterol 1.0 µg

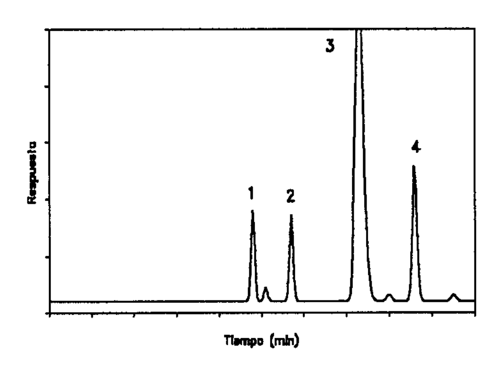
Columna: LiChroCart 250-4 Superspher Si 60

Eluyente:
n-Hexano/Alcohol Isoamílico (99.7:0.3)

Caudal: 2.0 ml/min

Inyección: 10 µl

Detector: UV 265 nm



Conservadores en mayonesa

1. Acido Benzoico 826 mg/kg
2. Acido Sórbico 663 mg/kg

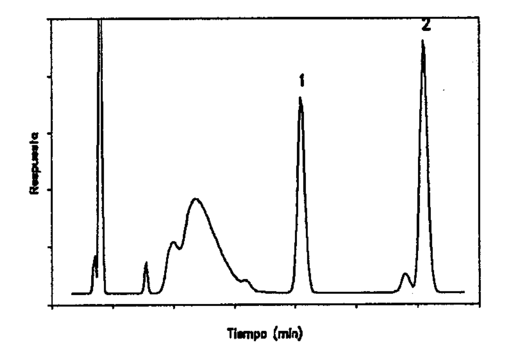
Columna: Hibar RT 250-4 LiChrosorb Si 60

Eluyente: n-Heptano/Eter Diisopropílico/Acido Acético Glacial (85:15:0.1)

Caudal: 2.0 ml/min

Inyección: 20 µl

Detector: UV 235 nm



Isómeros de Retinol

1. 13-Cis retinol palmitato
2. 11 Cis retinol palmitato
3. Trans retinol palmitato

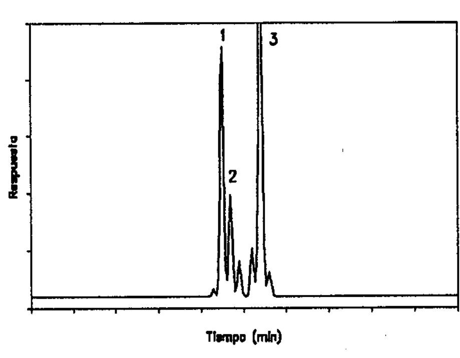
Columna: LiChroCart 250-4 Superspher Si 60

Eluyente: n-Hexano/Dibutileter (98:2)

Caudal: 1.0 ml/min

Inyección: 5 µl

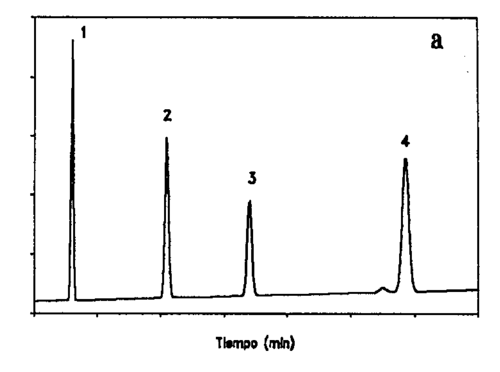
Detector: UV 325 nm



Separación de isómeros

1. Anisol
2. 3-Nitroanisol
3. 4-Nitroanisol
4. 2-Nitroanisol

Eluyente: n-Heptano/Dioxano (98:2)
Caudal: 1.0 ml/min
Inyección: 10 µl
Detector: UV 254 nm

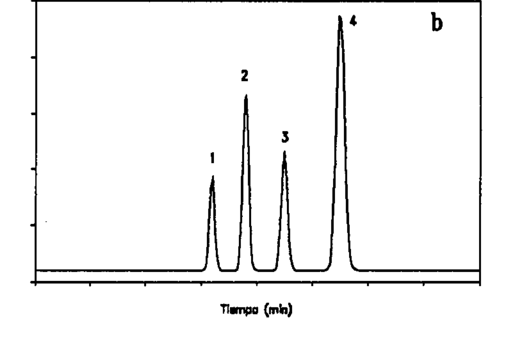


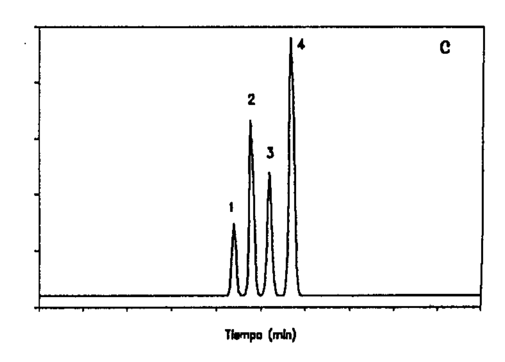
Los cromatogramas expuestos corresponden a rellenos con diferentes áreas superficiales que se detallan a continuación:

a) LiChrospher Si 60
a_s = 300 m²/ml

b) LiChrospher Si 300
a_s = 30 m²/ml

c) LiChrospher Si 1000
a_s = 10 m²/ml





Referencias

1. Tswett M., Ber. Dtsch. Bot. Ges. 24, 384, (1906).
2. Howard G., Martin A., Biochem. J. 46, 532, (1950).
3. Engelhardt H., Weigand N., Anal. Chem. 45, 1149, (1973).
4. Kiselev A.V., Nitkin Yu S., Frolov I.I. y Yashin I.Ya, J. Chromatogr 91, 187, (1974).
5. Snyder L.R., "Principles of Adsorption Chromatography", Dekker, N.Y. (1968).
6. Hansen S., Helboe P., Thomsen M., J. Chromatogr. 368, 39, (1986).
7. Unger K.K. "Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques", Chromatographic Science series Vol 47, Marcel Dekker Inc., N.Y., 1990.
8. Engelhardt H., Elgass H., "HPLC, Advances and perspectives", vol. 2, Cs. Horvárth, Academic Press, N.Y., 1980.
9. Snyder R.L., Kirkland J.J., "Modern Liquid Chromatography", Wiley New York (1974).
10. Snyder L.R., J. Chrom. Sci. 7, 595, (1969).
11. Kiselev A.V., J. Chromatogr. 49, 84 (1970).
12. Trappe W., Biochem Z. 305, 150 (1940).
13. Soczewinski E., Anal. Chem. 41, 179, (1968).
14. Snyder L.R., Anal. Chem. 46, 1384, (1974).
15. Scott R., Kucera P., Anal. Chem. 45, 749, (1973).
16. Scott R., Kucera P., J. Chromatogr 112, 425, (1975).
17. Scott R., Kucera P., J. Chromatogr 122, 35, (1976).
18. Scott R., Kucera P., J. Chromatogr 149, 93, (1978).
19. Snyder L.R., Poppe H., J. Chromatogr 184, 363, (1980).
20. Glajch J.L., Kirkland J.J. y Schindel W.G. Anal Chem 54, 1276, (1982).

Capítulo 7

Cromatografía de Intercambio Iónico

7.1 Introducción

En la cromatografía de intercambio iónico (IEC), la fase estacionaria contiene grupos funcionales iónicos y retiene el soluto, de características iónicas pero de signo opuesto, intercambiándolo por un proceso reversible con iones de la fase móvil.
El proceso se denomina de intercambio aniónico (ecuación 7-1) si el analito tiene carga negativa y catiónico (ecuación 7-2) si el analito tiene carga negativa positiva.

$$R^+ X^- + A^- \rightleftharpoons R^+ A^- + X^- \qquad (7\text{-}1)$$

$$R^- X^+ + C^+ \rightleftharpoons R^- C^+ + X^+ \qquad (7\text{-}2)$$

Donde R(±) representa al intercambiador iónico, X(±) al contraión de la fase móvil, con la carga correspondiente, C^+ y A^- al analito, catiónico y aniónico respectivamente.
La retención se debe a dos procesos independientes, en primer lugar, a una reacción reversible entre el soluto y el grupo cargado de la fase estacionaria (intercambio iónico) y en segundo lugar, a una distribución del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria, semejante a la que ocurre en fase reversa. En el proceso de intercambio, el contraión presente en la fase móvil (X en las ecuaciones propuestas) compite con el soluto por los sitios de intercambio de la fase estacionaria y su concentración, por efecto de ión común, será uno de los determinantes de la fuerza de elución de la fase móvil.
La IEC es una de las primeras técnicas cromatográficas modernas y se aplica desde la década del '60, en la que fue popular para la separación de bases de ácidos nucleicos, nucleótidos, nucleósidos y en general, de solutos iónicos, ionizables y neutros con capacidad de formar complejos iónicos. Sin embargo, la contribución de la IEC a la cromatografía moderna ha variado mucho durante los últimos años. Actualmente, sólo los iones inorgánicos, disociados en solución, independientemente del pH del medio, son tratados casi con exclusividad por IEC, dando lugar a una modalidad conocida simplemente como "Cromatografía de Iones"[34-36]. La separación de otros compuestos iónicos e ionizables, efectuada desde hace décadas por IEC, ha encontrado una creciente competencia y ha sido en gran medida desplazada por la cromatografía de apareamiento iónico (IPC), una modalidad de la cromatografía en fase reversa (ver sección 5.3). Este cambio gradual en la preferencia del analista se debe, en parte a la mayor estabilidad de los rellenos en comparación con los de IEC de base sílica, simplicidad y probablemente a que los analistas más jóvenes, que en general tienen sus primeras experiencias cromatográficas en RPLC, tienden a continuar por caminos conocidos.
Las especies ionizables, por su parte, corresponden a los ácidos y bases débiles y sus sales, que coexisten en su forma iónica y no iónica, en proporción determinada por el pH del medio de disolución. Las ecuaciones (7-3) y (7-4) muestran el equilibrio para un ácido y una base débiles.

$$AH \rightleftharpoons A^- + H^+ \quad (7\text{-}3)$$

$$B + H^+ \rightleftharpoons BH^+ \quad (7\text{-}4)$$

La concentración de las especies en equilibrio depende de su pKa y del pH del medio y puede estimarse por la ecuación de Henderson -Hasselbalch (11-1). Así, la separación en IEC estará regulada, para una base, por la ecuación (7-5) y para un ácido por la ecuación (7-6). Estas ecuaciones incorporan un término adicional, "C", correspondiente a la distribución del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si la única variable del sistema es el pH, el término C puede ser ignorado.

$$pH = pKa + \log \frac{[B]}{[BH^+]} + C \quad (7\text{-}5)$$

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[AH]} + C \quad (7\text{-}6)$$

Por definición de la constante de disociación y como se deduce de las ecuaciones (7-5) y (7-6), al pH correspondiente al pKa, forma iónica y no iónica coexistirán en igual proporción (ver figura 7.1). Dos unidades de pH por encima del pKa, un ácido contendrá un 99 % de forma iónica y dos unidades debajo del pKa, sólo el 1 % de la forma iónica. La inversa se cumple para una base débil. Dado que el intercambio se produce sólo con la forma iónica, el pH es, naturalmente, la primer variable a ajustar en la IEC de compuestos ionizables. La segunda variable está dada por la concentración del buffer y eventualmente una sal agregada. El catión o anión de igual carga a la del soluto compite con éste para la ocupación de los sitios activos de intercambio y la fuerza iónica modifica la posición de los equilibrios ya citados (7-3 y 4).

Si las especies se encuentran en estado no iónico, aún es posible la retención, en este caso debida a un proceso de partición entre las fases estacionaria y móvil. Como en la RPLC, la adición de un modificador orgánico (metanol, acetonitrilo, etc) produce una caída del tiempo de retención y la variación del modificador puede emplearse como variable para el ajuste de fuerza y selectividad.

Otra modalidad de IEC permite separar especies neutras que se tratan para formar complejos cargados, por ejemplo, carbohidratos, que pueden formar complejos con boratos[4], aminoácidos, que pueden ser tratados por intercambio de ligandos con metales (Cu, Ni), etc.

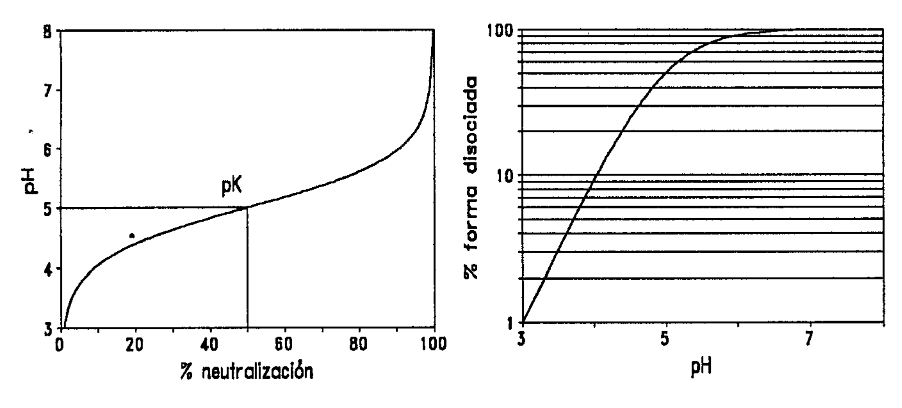


Fig. 7.1. Curva de neutralización (izquierda) y proporción de la forma iónica en función del pH (derecha) para un ácido débil de pKa 5.0, según se describe en la ecuación (7-3).

7.2 Materiales de relleno

Los intercambiadores aniónicos contienen un grupo ionogénico fuertemente o débilmente ácido (frecuentemente llamados SAX o WAX, por strong o weak anion exchanger). Los intercambiadores catiónicos, por su parte, contienen grupos ionogénicos fuertemente o débilmente básicos (SCX o WCX, por strong o weak cation exchanger). Los intercambiadores de mayor difusión son los fuertes (aniónicos o catiónicos), porque se encuentran disociados en todo el rango de pH. Los intercambiadores débiles sólo actúan como tales en aquellos rangos de pH que aseguran su disociación, por ejemplo, menor a 6 en los intercambiadores catiónicos ($-COO^-$) y menor a 8 en los aniónicos ($-NH_3^+$). Sin embargo, estos últimos son preferidos en aquellos casos en los cuales el intercambiador fuerte puede provocar retenciones muy acentuadas o irreversibles, típicamente, en la separación de péptidos y proteínas, para los cuales está difundido el uso de grupos dietilaminoetilo (DEAE).

La retención del soluto y la capacidad de carga de la columna de IEC dependen de la **capacidad** del intercambiador (ver figura 7.2). Esta capacidad puede definirse como la concentración "titulable" (capaz de ser dosada por acidimetría o alcalimetría) de sus grupos ionogénicos y varía mucho entre los distintos tipos de partícula.

Sin embargo, ese título no siempre se correlaciona exactamente con la capacidad real de retención, que depende de las condiciones experimentales. Por ejemplo, un material capaz de hincharse, sólo expondrá los grupos ionogénicos del interior de la partícula cuando el solvente facilite ese hinchamiento y la difusión efectiva del soluto. La capacidad de un intercambiador débil, por su parte, depende en mayor medida del pH del medio. Finalmente, existe una retención de los solutos no ionizados y de los solutos

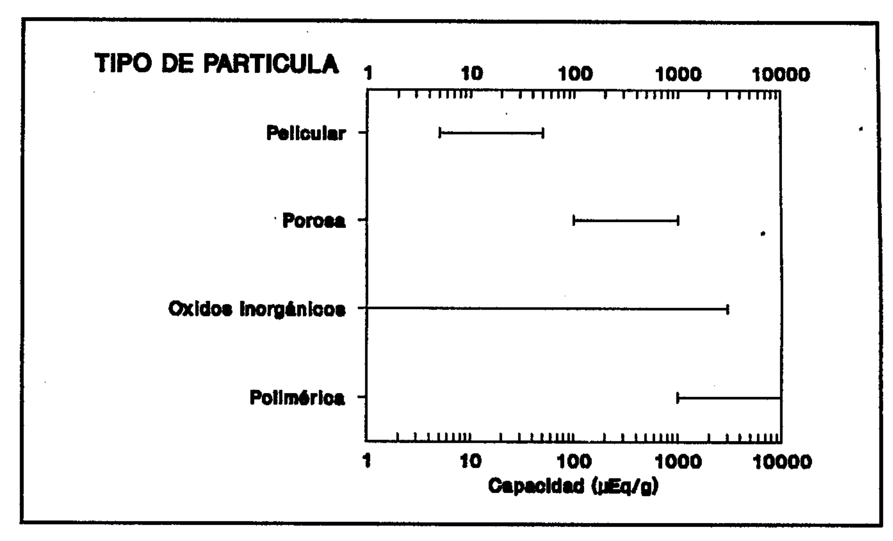


Fig. 7.2. Capacidad de intercambio de diferentes rellenos empleados en IEC (datos de referencia 1 y 6).

iónicos por partición, fenómeno independiente de la capacidad de intercambio. Aunque la funcionalidad de los intercambiadores iónicos descritos en bibliografía es muy amplia, la variedad disponible comercialmente es menor. La tabla 7.I muestra los más comunes.

Intercambiador catiónico		Intercambiador aniónico	
Fuertemente Acido	Débilmente Acido	Fuertemente Básico	Débilmente Básico
$-SO_3H$	-COOH	$-NR_3^+$	$-NH_3^+$
	$-PO_3H_2$		DEAE

Tabla 7.I. Grupos ionogénicos más comunes entre los intecambiadores aniónicos y catiónicos.

Los intercambiadores iónicos empleados en IEC pueden clasificarse en:

- Polímeros orgánicos
- Intercambiadores de Fase Ligada
- Oxidos Inorgánicos
- Intercambiadores Peliculares

Si bien la aplicación de la cromatografía de intercambio iónico antecede en décadas su

proyección en HPLC, sus principios son similares. De cualquier modo, las características de esta metodología establecen una serie de exigencias que llevaron a la adaptación de los rellenos. Básicamente, deben emplearse micropartículas porosas, de resistencia mecánica adecuada a las altas presiones empleadas y en las cuales la cinética del proceso de intercambio sea rápida.

Polímeros Orgánicos

La literatura de IEC describe varios tipos de materiales poliméricos, formados por reacción de ácido acrílico o metacrílico con poliaminas o con divinilbenceno, de epiclorhidrina con aminas, de formaldehido con fenol o con m-feniléndiamina. El material polimérico de mayor empleo es, sin embargo, un copolímero entrecruzado formado por estireno y divinilbenceno (EDVB). En este polímero, cuya síntesis se esquematiza en la figura 7.3, es evidente que el grado de entrecruzamiento, del que depende la rigidez del polímero, es determinada por el compuesto diolefínico. Otros factores como porosidad, tipo y tamaño de partícula, son regulados durante el proceso de polimerización.

Así, los primeros materiales poliméricos empleados en la IEC con bajo contenido de divinilbenceno eran geles blandos. Como los geles blandos poseen baja resistencia mecánica no soportan las presiones habituales de la HPLC. Así, su transferencia a ésta metodología requirió aumentar la rigidez, lo cual se consigue, como se indicó, aumentando el grado de entrecruzamiento. Sintetizado el material polimérico, se somete a distintos tipos de tratamiento, según se desee obtener material de intercambio aniónico o catiónico (ver figura 7.4). La sulfonación de los grupos aromáticos formará intercambiadores catiónicos. La clorometilación seguida por reacción con una amina terciaria llevará a la formación de intercambiadores aniónicos fuertes y si se continúa con amoníaco o una amina primaria o secundaria, a un intecambiador aniónico débil.

Fig. 7.3. Polimerización entrecruzada de estireno y divinilbenceno. El contenido de DVB determina el grado de entrecruzamiento del polímero.

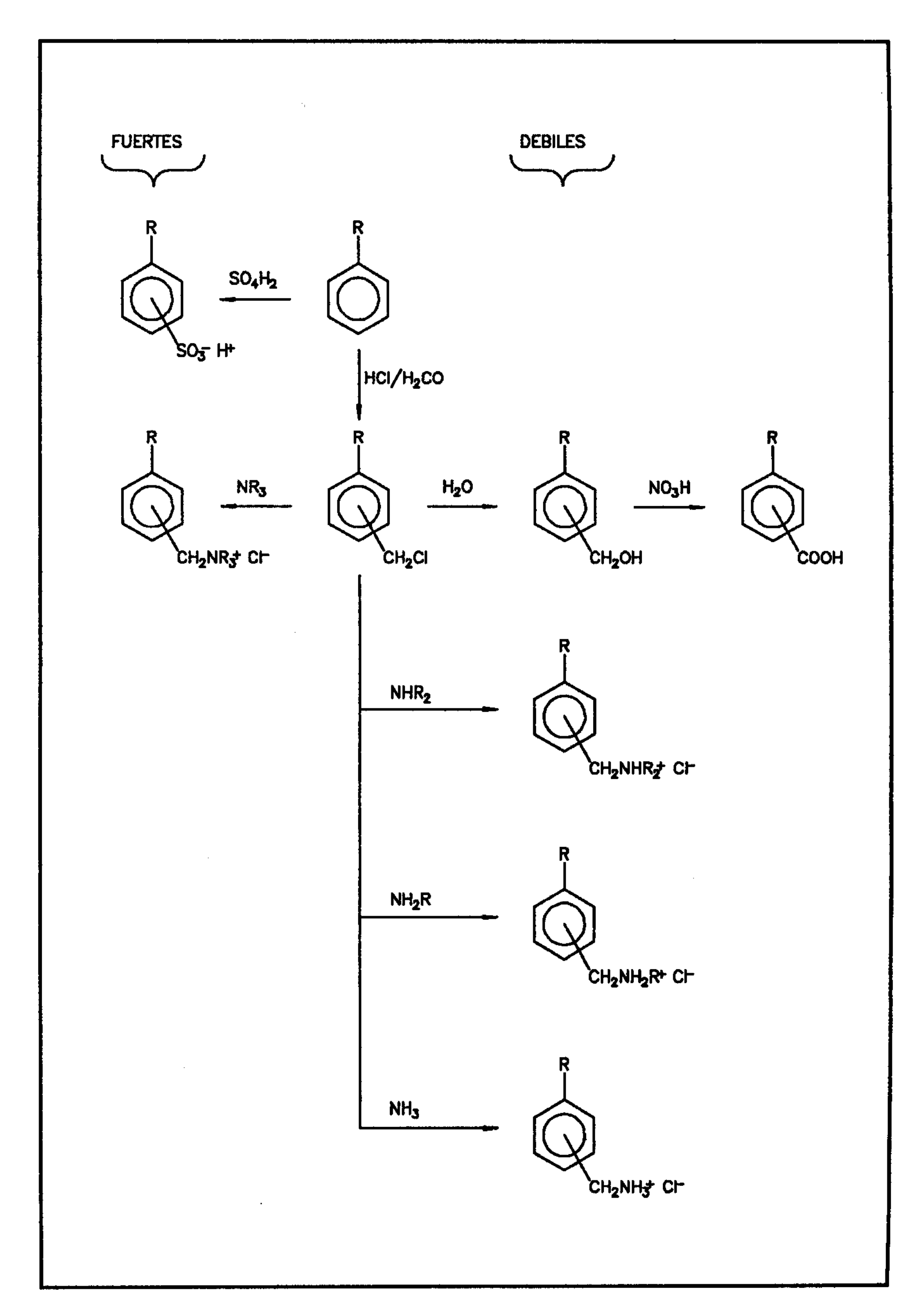


Fig. 7.4. Algunas de las posibles reacciones de sustitución aromática en el copolímero EDVB para la obtención de materiales de intercambio iónico. Adaptado de referencia 1.

Básicamente, existen dos tipos de partículas poliméricas, las microrreticulares (geles) y las macroporosas. Ambos tipos contienen grupos funcionales muy polares (restos sulfónicos o amonio cuaternario) que las inducen a la absorción de agua de la fase móvil y como consecuencia, se hinchan. Al deshidratarse, tienden nuevamente a contraerse. Este fenómeno no resulta tan intenso en el material macroporoso, por su mayor grado de entrecruzamiento. El hinchamiento seguido de compresión lleva a la creación de huecos en la cabeza de la columna y de canales intracolumna, ambos con pérdida de performance. En HPLC, el hinchamiento puede conducir a la compactación del lecho, con un aumento de la presión del sistema.
La principal ventaja de los polímeros orgánicos respecto de los de fase ligada (descritos más adelante) reside en su amplio rango de pH de trabajo, típicamente entre 1 y 13. La principal desventaja, sin embargo, se debe los fenómenos de hinchamiento-compactación.

Intercambiadores de Fase Ligada

Este material está constituido por una base o soporte, silicagel, a la cual se une covalentemente un grupo ionogénico ácido o básico, fuerte o débil. Se pueden producir partículas muy pequeñas, típicamente de hasta 3 μm de diámetro, con un estrecho rango de distribución, con áreas superficiales de más de 500 m^2/g y diámetro de poro comprendido entre 60 y 250 Å.
Como las características de la silicagel y el método de elaboración de los materiales de fase ligada han sido comentados en el capítulo 5, no nos extenderemos aquí en esos conceptos.
Estos materiales se emplean ampliamente en HPLC debido a su rigidez y a que no presentan fenómenos de hinchamiento. La velocidad de intercambio es rápida, debido a la distribución superficial de los grupos ionogénicos. Sin embargo, la solubilidad de la silicagel en medios acuosos, especialmente en medio alcalino, es responsable de la baja estabilidad y menor vida media de estas columnas y limita su rango de aplicación a pHs comprendidos entre 2 y 7.5. Esta puede ser una seria limitación para el análisis de compuestos que requieran pHs extremos para favorecer su estado iónico.

Oxidos Inorgánicos

En general, todos los óxidos y sales insolubles son intercambiadores iónicos potenciales. Así, los tradicionales rellenos de fase normal, silicagel[2] y alúmina[3], se han empleado con éxito para la separación de iones en HPLC (ver figuras 7.6 y 7.7).
Las características de intercambio de los óxidos de propiedades anfotéricas están dadas por su pH isoeléctrico, es decir, el valor de pH en el cual su carga neta superficial es cero. Por encima del pH isoeléctrico (por ejemplo, 7.5 para alúmina[1]), el óxido tendrá carga negativa y se comportará como intercambiador catiónico y por debajo de ese pH, tendrá

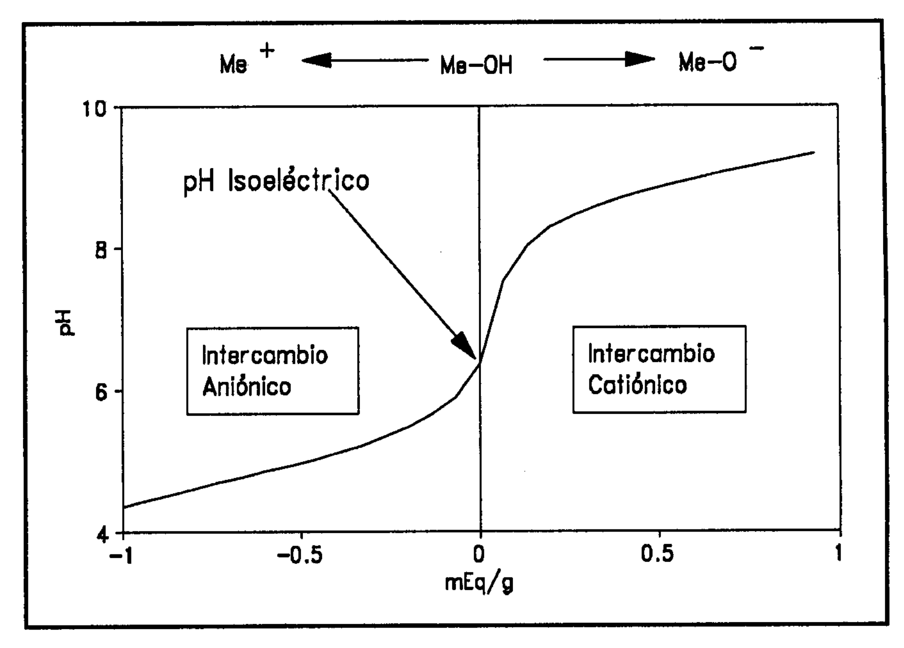
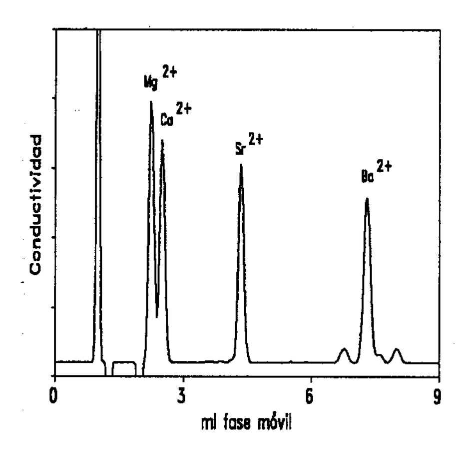


Fig. 7.5. Curva de titulación de un óxido metálico hipotético, de propiedades anfotéricas. Según el pH del medio, se comportará como intercambiador aniónico o catiónico, de capacidad también variable.

carga positiva y funcionará como intercambiador aniónico (ver figura 7.5). La capacidad de intercambio también dependerá, para un mismo material, del pH del medio y consecuentemente, de su estado iónico superficial.

Las características de estos materiales como intercambiadores iónicos, sin embargo, no son muy claras, ya que dependen no sólo del pH sino también de factores del entorno (temperatura, solvente, tipo de soluto, de contraión) y de la historia de la partícula (método de elaboración, tratamiento térmico). A pesar de la existencia "física" de los grupos ionogénicos, estas variables definirán la estructura cristalina, grado de hidratación, porosidad, área superficial, tamaño y morfología de la partícula, parámetros determinantes del grado de disponibilidad y reactividad de esos grupos funcionales.

En condiciones apropiadas, la capacidad de intercambio puede ser bastante alta (hasta 3 mEq/g). Las ventajas de estos materiales están dadas especialmente por su rigidez, que les brinda gran estabilidad física y térmica y por la ausencia de fenómenos de hinchamiento-compactación, propia de los geles. La mayor desventaja se debe, sin embargo, a la solubilidad en soluciones acuosas. La silicagel puede emplearse hasta pH 7.5 y por su bajo pH isoeléctrico (2.2), sólo para el intercambio catiónico. La alúmina, menos soluble y de características anfotéricas más pronunciadas, es útil hasta pH 12 y puede emplearse para el intercambio catiónico o aniónico, según el rango de pH seleccionado.



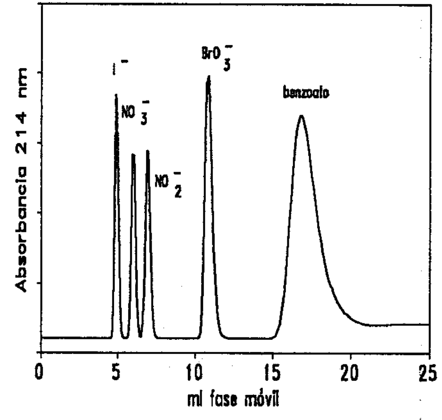


Fig. 7.6. Silicagel como material de IEC. Columna: Zorbax SIL, fase móvil: MeOH-H_2O 1:4 con citrato Na 3.10^{-3}M, pH 7.41 a 1.0 ml/min. (de referencia 2, con permiso del editor).

Fig. 7.7. Alúmina como material de IEC. Columna: Spherisorb A5Y, fase móvil: buffer acetato 0.001 M pH 5.60 a 1.0 ml/min. Fuerza iónica: 0.05 M con $NaClO_4$ (de referencia 3, con permiso del editor).

Intercambiadores Peliculares

Estos materiales están compuestos por una fina capa de material de intercambio que recubre un core inerte, generalmente de vidrio o micropartículas de sílica. El centro inerte representa aproximadamente el 98 % del volumen de la partícula y el material de recubrimiento es una fina capa de intercambiador, constituido en general por el copolímero EDVB, que puede transformarse fácilmente en material de intercambio catiónico o aniónico por alguno de los mecanismos descritos. La capacidad de intercambio (y en consecuencia la capacidad de carga de la columna) es baja, entre 5 y 100 μEq/g.

Este tipo de material siguió históricamente a los geles blandos tradicionales, en los cuales el mayor problema era la lenta difusión del soluto entre los microporos, la fragilidad y el hinchamiento del gel. El material pelicular resolvió estos problemas aportando la resistencia mecánica del core y una matriz activa de bajo espesor, evitando la lenta difusión del soluto y produciendo columnas más permeables (de menor resistencia al caudal, con menor presión del sistema). En contrapartida, como las partículas peliculares son más grandes que las poliméricas, la eficiencia es menor y la fricción o compresión excesiva puede decapar las partículas, especialmente si la capa polimérica superficial se encuentra hinchada o su grado de entrecruzamiento es bajo. El empleo actual de materiales peliculares está muy limitado, casi exclusivamente a la confección de guardacolumnas.

7.3 La Fase Móvil

La fase móvil en IEC es, en general, una solución acuosa de pH y fuerza iónica controlados por medio de un buffer y puede contener cantidades moderadas (habitualmente no más de 30 %) de un modificador orgánico, metanol o acetonitrilo.
Si bien el mecanismo de la retención no está completamente dilucidado, se sabe que participan dos procesos: intercambio iónico (sobre el cual influyen el pH y la fuerza iónica) y partición entre las fases en equilibrio (la fase móvil y la fase estacionaria), tal como ocurre en RP. Sobre este segundo mecanismo actúan los modificadores orgánicos, que permiten un control adicional sobre la retención (a mayor concentración de modificador, menor retención) y sobre la selectividad.
La fuerza o poder de elución de la fase móvil es proporcional a la fuerza iónica (I), dada por la ecuación (7-7). A mayor fuerza iónica, mayor fuerza del solvente y menor retención.

$$I = 1/2 \sum_{i=1}^{n} C_i \; Z_i^2 = 1/2 \; (C_1 \; Z_1^2 + C_2 \; Z_2^2 + ...) \qquad (7\text{-}7)$$

Donde Ci es la concentración iónica de la especie i (aniones y cationes contribuyen individualmente) y Zi su carga (valencia).
Es claro que la fuerza iónica (y la fuerza del solvente), son altamente dependientes de la valencia del contraión. Así, si el contraión es monovalente (Na^+, K^+, NO_3^-), la retención será inversamente proporcional a su concentración. Si el contraión es divalente (Cu^{++}, Ni^{++}, $SO_4^=$), la retención será inversamente proporcional al cuadrado de su concentración. En general, la fuerza iónica como parámetro absoluto sólo varía la fuerza de la fase móvil, no su selectividad.
Por otra parte, la fuerza iónica debe ajustarse de acuerdo a la capacidad del intercambiador. Para un relleno determinado, la retención depende de su cantidad de sitios activos y consecuentemente, de su capacidad de intercambio. Si por ejemplo, un material polimérico poroso con una capacidad de 5 mEq/g requiere $NaNO_3$ 0.5 M como fase móvil, un material pelicular con capacidad de intercambio reducida unas 100 veces necesitará también reducir la fuerza de la fase móvil en la misma proporción ($NaNO_3$ 0.005 M), para mantener el rango de k'.
Por otra parte, para la misma fuerza iónica, el **tipo de contraión** influye sobre la fuerza de elución. La retención (k') aumenta, para el intercambio aniónico en la secuencia[1,5,6]

Citrato < $SO_4^=$ < Oxalato < I^- < NO_3^- < $CrO_4^=$ <
Br^- < SCN^- < Formiato < Acetato < HO^- < F^-

Debe evitarse sin embargo el empleo de haluros en HPLC por el efecto deletéreo sobre el material de acero inoxidable. Por su parte, la fuerza del contraión para el intercambio

catiónico decrece en el orden

$Ba^{++} < Pb^{++} < Sr^{++} < Ca^{++} < Ni^{++} < Cd^{++} < Cu^{++} <$
$Co^{++} < Zn^{++} < Mg^{++} < UO_2^{++} < Tl^{+} < Ag^{+} < Cs^{+} <$
$Rb^{+} < K^{+} < NH_4^{+} < Na^{+} < H^{+} < Li^{+}$

El efecto del pH es claro a partir de las ecuaciónes (7-5 y 6). El mayor efecto del pH sobre la retención se producirá en las cercanías del pKa, ya que es allí donde se ejerce el control sobre la ionización. Si para un ácido el pH está 2 unidades debajo de su pKa, sólo el 1 % de éste estará ionizado y la retención será baja. Lo mismo ocurrirá para una base orgánica a 2 unidades de pH por encima de su pKa.
Finalmente, un aumento de la temperatura reduce la viscosidad de la fase móvil, lo que resulta en un aumento de la eficiencia. Sin embargo, este parámetro debe manejarse con cuidado con rellenos de base sílica ya que su solubilidad aumenta a altas temperaturas, especialmente por efecto del pH y la fuerza iónica.

Variable	Efecto
pH	La retención depende del pKa del soluto. Permite variar tanto la fuerza como la selectividad
Fuerza iónica	A mayor fuerza iónica, mayor fuerza de elución (menor tiempo de retención). Escasa participación sobre la selectividad.
Contraión	A mayor valencia, mayor influencia (en proporción directa) sobre la fuerza iónica. El tipo de contraión (incluso a igual valencia) determina la fuerza de elución (ver texto).
Modificador Orgánico	A mayor proporción de modificador (MeOH, AcN), menor retención. Efecto sobre fuerza y selectividad.
Temperatura	A mayor temperatura, mayor eficiencia y menor retención.
Capacidad de Intercambio de la partícula	A mayor capacidad, mayor retención. Mayor capacidad requiere mayor fuerza iónica de la fase móvil

Tabla 7.II. Variables en Cromatografía de Intercambio iónico.

7.4 Cromatografía de iones

Esta modalidad es en general la preferida para la separación de iones inorgánicos. Como la mayoría de estos iones no son cromóforos, o absorben a baja longitud de onda, los primeros detectores aplicados a estas separaciones explotaron una característica universal y distintiva de los iones, la conductividad. Aunque el detector de conductividad sigue empleándose, actualmente existen varias alternativas a este modo de detección[10], entre otras, la amperometría (detectores electroquímicos), potenciometría, espectrofotometría UV directa o indirecta, etc.

El primer problema enfrentado con los detectores de conductividad se debía a la alta capacidad de intercambio de los rellenos, es decir, su alta capacidad de retención. Esto obligaba al empleo de eluyentes de alta fuerza iónica y el análisis de soluciones diluidas presentaba una respuesta baja del analito contra una alta señal de fondo debida al eluyente. Este problema fue resuelto recién en 1975 por Small[7], quién desarrolló un nuevo método, la cromatografía de ión suprimido.

Cromatografía de Ión Suprimido

Small[7] resolvió el problema de la señal de fondo empleando una combinación de columnas. La primera, llamada **separadora**, tiene la función de separar de los componentes de la muestra y la segunda, llamada **supresora**, de eliminar los electrolitos presentes en la fase móvil (ver figura 7.8). Por ejemplo, para una mezcla de cationes utilizó un intercambiador catiónico, con un ácido diluido (HCl 0.01 N) como fase móvil. En la columna supresora, empleó un intercambiador aniónico fuerte, que elimina el anión del ácido intercambiándolo por HO^- y deja libre el catión (M^+) que puede así cuantificarse con un alto nivel de sensibilidad. Así:

$$\text{Supresor}^+OH^- + H^+Cl^- \rightarrow \text{Supresor}^+Cl^- + H_2O$$
$$\text{Supresor}^+OH^- + M^+Cl^- \rightarrow \text{Supresor}^+Cl^- + M^+OH^-$$

Para el análisis de aniones (A^-), empleó una columna separadora de intercambio aniónico, eluyendo con fenolato de sodio y un intercambiador catiónico fuerte entre la primera y el detector. Así:

$$\text{Supresor}^-H^+ + \text{Phe-}O^-Na^+ \rightarrow \text{Supresor}^-Na^+ + \text{Phe-OH}$$
$$\text{Supresor}^-H^+ + A^-Na^+ \rightarrow \text{Supresor}^-Na^+ + A^-H^+$$

La elección del contraión no es casual y merece una atención especial. Para el caso de aniones, Small resalta la conveniencia del fenolato sobre el NaOH por la baja disociación del fenol formado y consecuentemente, la baja contribución a la conductividad. El inconveniente de este sistema es, como puede suponerse, la necesidad de regenerar la columna supresora. Esta regeneración puede hacerse con menor frecuencia si se emplea

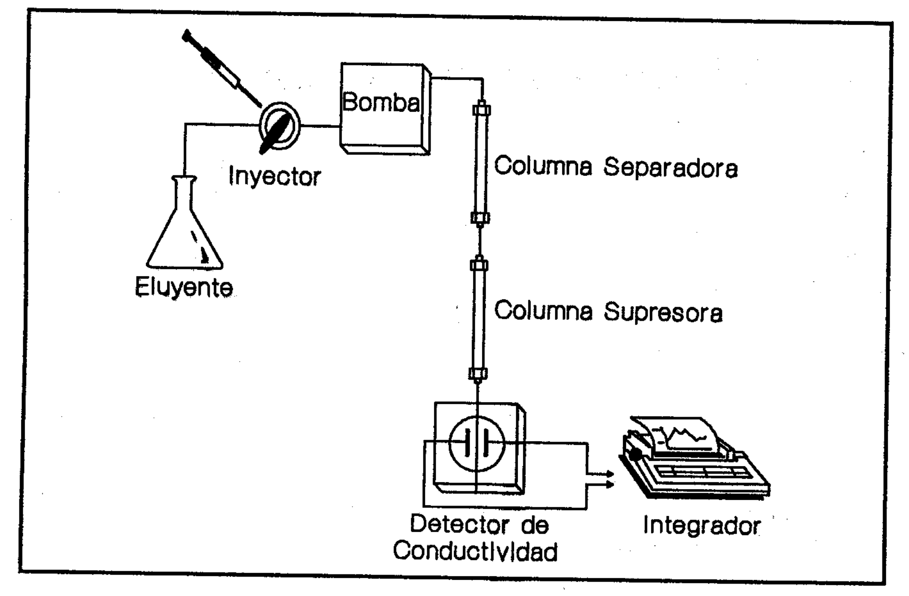


Fig. 7.8. Equipo para cromatografía de supresión iónica. La columna separadora contiene un intercambiador de baja capacidad y la supresora, uno de alta capacidad, para prolongar el tiempo entre regeneraciones.

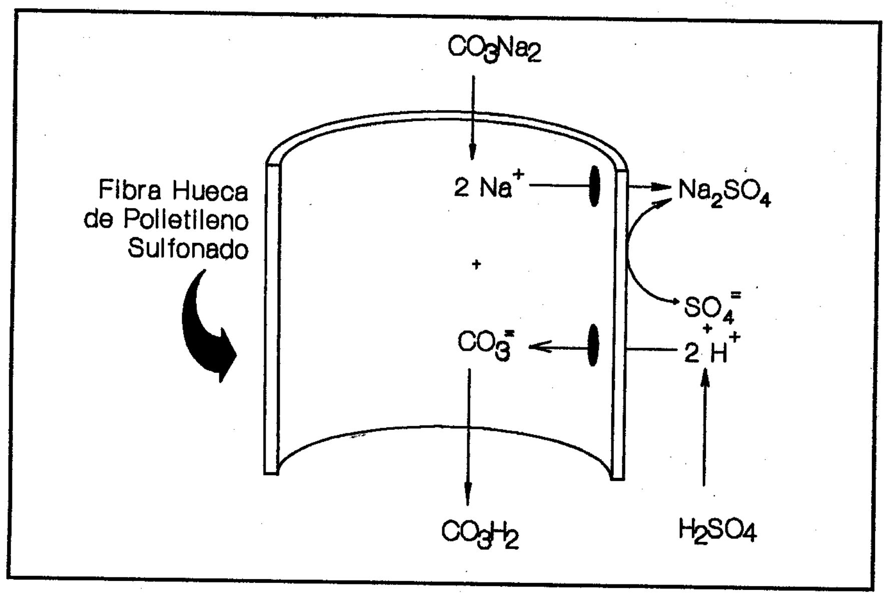
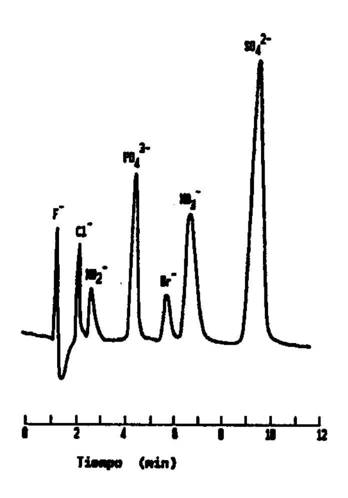


Fig. 7.9. Supresor de fibra hueca para el sistema de supresión iónica (de referencia 7, reproducido con permiso del editor).

un material de baja capacidad en la columna separadora. De esta forma, se pueden emplear fases móviles de menor fuerza iónica, que tardarán mayor tiempo en saturar una columna supresora de alta capacidad. Aún así, el proceso debe interrumpirse en algún momento para regenerar la columna supresora (6 a 24 hs de trabajo). Por otra parte, este sistema tiene otros problemas, en especial, debidos a cambios en la respuesta del sistema a medida que va agotando la capacidad de intercambio del supresor y a fenómenos de exclusión.
Unos años más tarde, Stevens, Davis y el mismo Small[8] propusieron un dispositivo continuo, el supresor de fibra hueca (ver figura 7.9). En este caso, el contraión, por ejemplo carbonato de sodio empleado como eluyente en el intercambio aniónico, se hace pasar por el centro de una fibra hueca formada por una membrana de intercambio (polietileno sulfonado). La membrana intercambia H^+ por sodio del Na_2CO_3 y por fuera de ésta, una fuente de H^+ de circulación continua (H_2SO_4) regenera la membrana reemplazando su Na^+ por H^+. Este sistema elimina los problemas de la columna supresora, pero agrega otros, en particular, un mayor ensanchamiento de banda por el volumen muerto que agrega el dispositivo y consecuentemente, menor resolución. Estos inconvenientes fueron luego compensados[9] rellenando las fibras huecas con un material inerte (partículas de EDVB). El sistema de supresión iónica está patentado y sólo es comercializado por Dionex[14].
Las figuras 7.10 y 7.11 muestran una separación de aniones empleando, respectivamente, un supresor convencional elaborado con una columna Dowex 50W-X16, un supresor de fibra hueca (Nafion 811-X) y la misma fibra empaquetada con partículas inertes de 500 µm de diámetro. En éstas, se hace evidente la ganancia de eficiencia, derivada del menor volumen muerto aportado por el supresor.

Cromatografía Iónica de Columna Unica

Como alternativa a la supresión iónica, algunos años más tarde se introdujo otra modalidad, la cromatografía iónica de columna única (SCIC, single-column ion chromatography). Este método[11,12], que evita el uso de una columna supresora, emplea una columna de intercambio iónico de capacidad muy baja, típicamente de unos 0.005 - 0.10 mEq/g, con un eluyente de baja concentración, por ejemplo 0.1 mM. De este modo, la conductividad del eluyente es suficientemente baja para la detección conductimétrica y la diferencia de señal entre soluto y solvente, naturalmente pequeña, suele realzarse escogiendo cuidadosamente el contraión de la fase móvil. Fritz, uno de los creadores de la técnica, estudió la respuesta entre varias alternativas[12,13] sugiriendo el empleo de ácido nítrico o etilendiamonio para el análisis de cationes y ácidos orgánicos (ftálico, benzoico, succínico, nicotínico) para los aniones. En la tabla 7.III pueden encontrarse alguna de estas alternativas para el análisis de aniones.



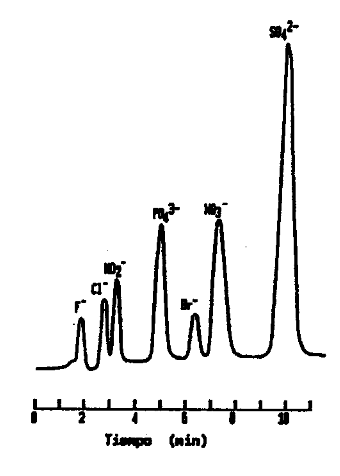


Fig. 7.10. IEC de aniones empleando una columna convencional (izquierda) y un supresor de fibra hueca (derecha) con detector de conductividad. De referencia 9, con permiso del editor.

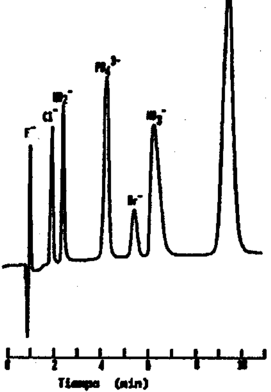


Fig. 7.11.
IEC de los aniones de la figura 7.9, empleando un supresor de fibra hueca empaquetado (de referencia 9, reproducido con autorización del editor).

Fase móvil	Concentración	pH	Detección
Biftalato de Potasio	0.5-10 mM	1-6.2	Conductividad UV indirecto, 280 nm
Benzoato de Sodio	0.1-5 mM	3.2-5.2	Conductividad UV indirecto, 280 nm
Ac. p-hidro-xibenzoico	3-10 mM	3.5-5.5 8.3-10.3	Conductividad UV indirecto, 370 nm
Fenolato de Sodio	1-100 mM	9-11	Conductividad
Hidróxido de potasio	3-100 mM	11-13	Conductividad

Tabla 7.III. Aditivos más empleados en cromatografía de intercambio aniónico con columna simple (cortesía de Hamilton Co.).

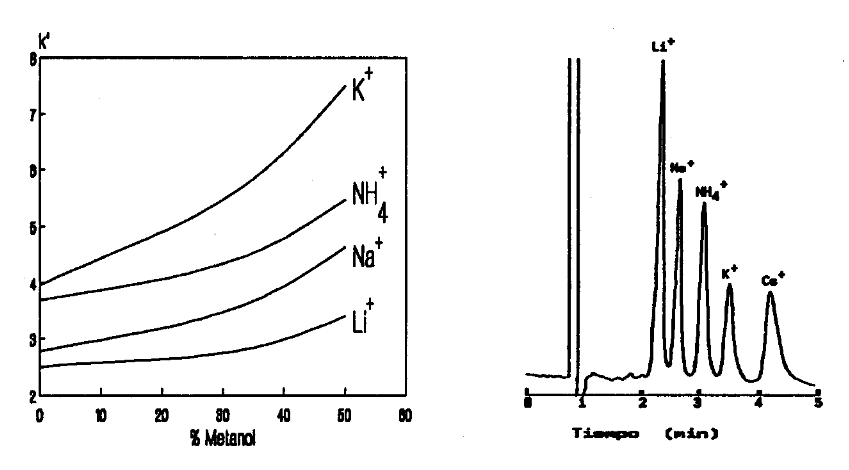


Fig. 7.12. Separación de metales alcalinos por SCIC, columna: PRP-X200, solvente: HNO_3 4×10^{-3}N a 2 ml/min, 100 ppm de cada ión (cortesía de Hamilton Co.).

Fig. 7.13. SCIC de aniones. Columna: Polyspher IC AN (EDVB ligado a amonio cuaternario). Fase móvil: biftalato de potasio 0.75 mM - etilenglicol - 2 - propanol (1000:5:20) a 1.0 ml/min. Cortesía de E. Merck.

Métodos de Detección

El detector más empleado en cromatografía de iones es el conductimétrico. Sin embargo, en los laboratorios de tareas muy variadas y especialmente en aquellos en los que el control de muestras iónicas no es frecuente, es natural que se busque la mayor versatilidad de los equipos disponibles. Parece así normal que se observe una tendencia creciente al empleo de los detectores espectrofotométricos, sin duda los más difundidos, e incluso de otros menos comunes como los electroquímicos, de índice de refracción, etc. Como breve reseña de métodos de detección en cromatografía de iones podemos citar:

- **Detector de Conductividad**. Es un detector de manejo sencillo, económico por carecer de componentes ópticos y universal con respecto a los iones. Su respuesta es proporcional a la diferencia de conductividad entre el soluto y la fase móvil (ver figura 7.6, 10 y 11). Así, se han adoptado dos modalidades, la primera consiste en emplear un contraión de baja conductividad (biftalato, benzoato, fenolato, etc), de modo que el soluto produzca una señal positiva y proporcional a su concentración. La segunda emplea un contraión de alta conductividad (HNO_3 para aniones, KOH para cationes, etc) y el pasaje del soluto por la celda produce una caída de la señal. En este caso, la señal es también proporcional a la concentración del soluto y como su signo es negativo, se la conoce como detección "indirecta".

- **Detector Espectrofotométrico**. En este caso se mide la absorbancia del eluato a una longitud de onda definida y la señal es, dentro de parámetros establecidos, proporcional la concentración del soluto. Como en la detección conductimétrica se han descrito dos modalidades, la medición directa y la indirecta. En el caso más simple el soluto presenta una banda de absorción definida y la medición se efectúa del modo convencional, en lo posible, en el máximo de absorción. Salvo excepciones (nitritos, nitratos), es necesario efectuar la medición a baja longitud de onda, típicamente entre 190 y 214 nm (ver figura 7.7). Esta modalidad se aplica sin dificultades para el análisis de algunos iones inorgánicos[15-17] (nitrito, nitrato, ioduro, iodato, bromuro) o bien ácidos orgánicos débiles (acetato, oxalato, propionato, etc).
  Otra alternativa consiste en agregar determinados aditivos a la fase móvil. Estos aditivos (en general los contraiones mismos) se seleccionan de modo de generar una señal (absorción) continua en el detector UV. La elución del soluto, de menor absorbancia que el aditivo, produce una dilución de éste en la celda y una caída de la absorbancia. La señal se registra como un pico negativo de magnitud proporcional a la concentración del soluto (ver figura 7.14). Este método se denomina espectrofotométrico "indirecto" o "vacante" y se han empleado, para intercambio aniónico: ftalatos y boratos a 250 y 270 nm, ácido salicílico a 288 nm y ftalatos a 280 nm[20-22]. Por su parte, para intercambio catiónico se han empleado Cu(II) y Ce(III) a 254 nm (ver figura 7.14) y benziltrimetilamonio[23,24] a 275 nm.
  Otra modalidad habitual para el análisis de cationes es la formación y separación de

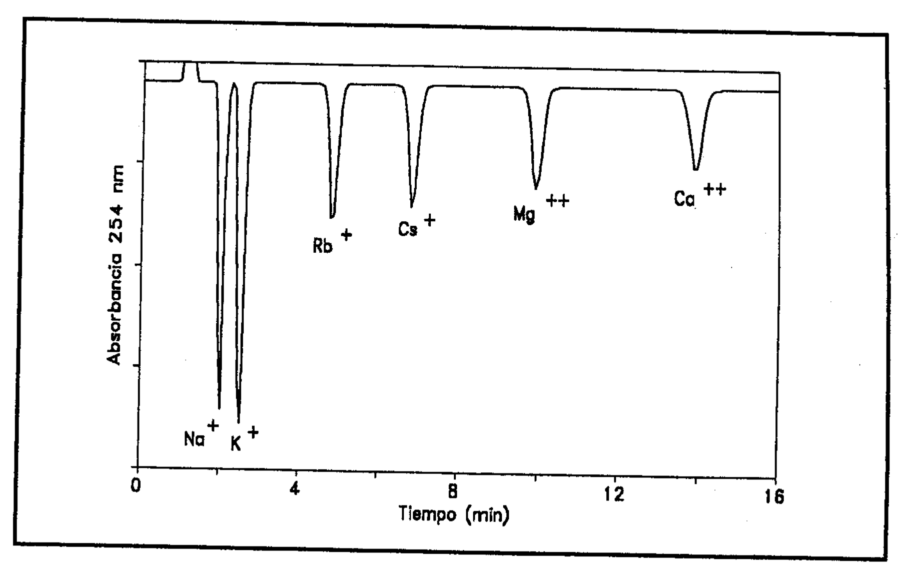


Fig. 7.14. Separación de cationes por espectrofotometría indirecta. Columna: ION-210 (EDVB, grupo sulfónico). Fase móvil: Ce(III) 0.1 mM a 1 ml/min (de referencia 23, con autorización del editor).

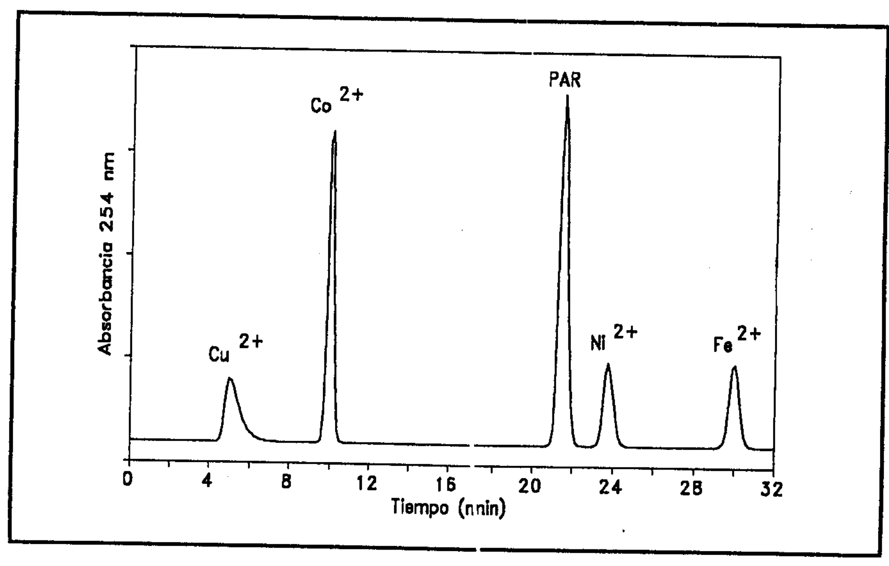


Fig. 7.15. Complejos metálicos de piridil-azo resorcinol (PAR). Columna: Biophase ODS, fase móvil: buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.5-MeOH (65:35) a 1.0 ml/min (de referencia 25, con autorización del editor).

sus productos de reacción con complejantes. Por ejemplo, se han separado complejos metálicos de 4-(2-Piridilazo)-resorcinol, 1,10-fenantrolina, hexametilenditiocarbamato, ácido 1,8-dihidroxinaftaleno-3,6-disulfónico y ácido hidroxámico[25-33], en todos los casos, medidos por espectrofotometría directa, en la zona UV o visible del espectro (ver figura 7.15).

- **Detector Electroquímico.** Es un detector muy sensible y selectivo hacia las especies capaces de ser oxidadas o reducidas (entre otros, nitritos, ioduros, sulfitos), e incluso complejos[18,19], como los que puede formar el ditiocarbamato con cobre, níquel, cadmio, etc.

  En este caso, se induce el proceso de oxidación o de reducción del soluto en la celda del detector, aplicando un voltaje regulado. Ese potencial es el factor determinante de la selectividad (del mismo modo que la longitud de onda determina la selectividad de una medición espectrofotométrica) y se mide la señal amperométrica (de la corriente, en nA) al potencial definido.

  El potencial necesario (E) puede estimarse por la ecuación de Nernst (7-8), conociendo el potencial de oxido-reducción del soluto (Eo).

$$E = E_0 - \frac{0.059}{2} \log \frac{[RED]}{[OX]} \qquad (7\text{-}8)$$

Por su parte, la corriente medida (7-9) "i" será proporcional a:

$$i = n - \frac{F\ A\ D\ C}{\delta} \qquad (7\text{-}9)$$

Donde n es el número de electrones transferidos, F la constante de Faraday, A el área del electrodo, D la constante de difusión del analito y δ el espesor de la capa de difusión (que depende de la geometría de la celda).

Referencias

1. Pietrzyk D., "Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques", cap. 10, Unger K., Marcel Dekker Inc, N.Y., 1990.
2. Smith R., Pietrzyk D., Anal. Chem. 56, 610, (1984).
3. Schmitt G., Pietrzyk D., Anal. Chem. 57, 2247, (1985).
4. Voelter W., Bauer H., J. Chromatogr. 126, 693, (1976).
5. Snyder L., Kirkland J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2da. ed., cap. 10, J. Wiley, N.Y., 1979.
6. Ahuja S., "Selectivity and Detectability Optimizations in HPLC", J. Wiley, N.Y., 1989.
7. Small H., Stevens T., Bauman W., Anal. Chem. 47, 1801, (1975).
8. Stevens T., Davis J., Small H., Anal. Chem. 53, 1488, (1981).
9. Stevens T., Jewett G., Small H., Anal. Chem. 54, 1206, (1982).
10. Haddad P., Chromatographia 24, 217, (1987).
11. Gjerde D., Schuckler G., Fritz J., J. Chromatogr. 186, 509, (1979).
12. Fritz J., Gjerde S., Becker R., Anal. Chem. 52, 1519, (1980).
13. Fritz J., DuVal D., Barron R., Anal. Chem. 56, 1177, (1984).
14. Baum R., C&EN, p.9, mayo 20, 1985.
15. Skelly N., Anal. Chem. 54, 712, (1982).
16. Williams R., Anal. Chem. 55, 851, (1983).
17. Lulla H. y col., J. Pharm. Sci. 73, 1004, (1984).
18. Bond A., Wallace G., Anal. Chem. 55, 718, (1983).
19. Bond A., Wallace G., Anal. Chem. 56, 2085, (1984).
20. Jenke D., Anal. Chem. 56, 2468, (1984).
21. Bidlingmer B. y col., Anal. Chem. 59, 1843, (1987).
22. Brown D. y col., Anal. Chem. 57, 2264, (1985).
23. Sherman J., Danielson N., Anal. Chem. 59, 490, (1987).
24. McAleese D., Anal. Chem. 59, 541, (1987).
25. Roston D., Anal. Chem. 56, 241, (1984).
26. O'Laughlin J., Hanson R., Anal. Chem. 52, 2263, (1980).
27. O'Laughlin J., Anal. Chem. 54, 178, (1982).
28. Rigas P., Pietrzyk D., Anal. Chem. 58, 2226, (1986).
29. Rigas P., Pietrzyk D., Anal. Chem. 59, 1388, (1987).
30. Ichinoki S., Yamazaki M., Anal. Chem. 57, 2219, (1985).
31. Motomzu S. y col., Anal. Chem. 55, 1629, (1983).
32. Hayakawa K. y col., Anal. Chem. 59, 2241, (1987).
33. Palmieri M., Fritz J., Anal. Chem. 59, 2226, (1987).
34. Haddad P., Heckenberg A., J. Chromatogr. 300, 357, (1984).
35. Small H., Anal. Chem. 55, 235A, (1983).
36. Fritz J., Anal. Chem. 59, 335A, (1987).

Capítulo 8

Cromatografía de Exclusión Molecular

8.1 Introducción

Entre los métodos clásicos de cromatografía líquida: adsorción, partición, fase reversa, intercambio iónico y exclusión, la cromatografía de exclusión molecular (SEC por size exclusion chromatography) fue el último en ser desarrollado. El primer trabajo por exclusión molecular, aplicado para la separación de biopolímeros, fue informado por Flodin y Porath en el año 1959[1] y luego, en 1964, Moore[2] aplicó esta metodología a la separación de polímeros introduciendo los primeros rellenos rígidos de poliestireno entrecruzado y definiendo el término GPC, que continúa utilizándose en la actualidad. Según la naturaleza de los compuestos que se han de separar por SEC, esta metodología se clasifica en **cromatografía de filtración por gel** (GFC por gel filtration chromatography) o **de permeación por gel** (GPC por gel permeation chromatography). A pesar de esta clasificación, tanto los mecanismos involucrados en la separación como el equipamiento (en términos generales) no difieren entre ambos métodos. La diferencia más significativa reside simplemente en que mientras la GFC se emplea para el análisis de sustancias hidrosolubles (proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono), la GPC se utiliza para el análisis compuestos insolubles en agua, en particular para polímeros sintéticos y elastómeros (cauchos, plásticos, resinas).

En general la SEC se utiliza para el análisis de compuestos de peso molecular mayor que 2000, los cuales, de hecho, suelen presentar problemas en los otros modos cromatográficos. Sin embargo, Bidlingmeyer y Warren[3] lo emplearon para el análisis de compuestos de bajo peso molecular, en particular para la separación de metil y propilparahidroxibenzoatos (pesos moleculares 152.15 y 180.2 respectivamente), varios compuestos de interés farmacéutico e hidrocarburos desde C5 hasta C36. Si bien la aplicación de la SEC al análisis de compuestos de bajo peso molecular no se encuentra demasiado difundida, es útil para la separación de compuestos siempre que los mismos tengan una diferencia de, como mínimo, 10 % en sus pesos moleculares[3]. Por su parte, Screenivasan y col[4] utilizaron esta metodología para la separación de Aspirina de su producto de hidrólisis, el ácido salicílico, compuestos cuyos pesos moleculares difieren sólo en 28.05 unidades.

La cromatografía de exclusión separara sustancias en base a su **tamaño efectivo en solución**. Como el tamaño efectivo de una molécula en solución y su peso molecular son parámetros proporcionales (en determinadas condiciones), esta modalidad cromatográfica suele utilizarse tanto para la determinación del peso molecular y como la distribución de pesos moleculares. La diferencia entre ambos parámetros se comprende al evaluar la macromolécula: mientras una proteína o un ácido nucleico tienen una estructura molecular fija y definida y por lo tanto una masa molecular única, un polímero tendrá una longitud (y peso molecular) variable según el proceso de síntesis, y aún en condiciones perfectamente controladas, estará constituido por una mezcla, más o menos homogénea de homólogos. Así por ejemplo, se puede evaluar el peso molecular de una proteina, pero en el caso de un polímero se estudian sus pesos moleculares medios, la distribución de

pesos moleculares y la dispersidad, la definición y cálculo de estos parámetros se discutirá en la sección 8.7.

La cromatografía de exclusión molecular es el modo cromatográfico más simple y predecible y requiere, en relación a las otras modalidades cromatográficas, menor esfuerzo en cuanto al desarrollo de los métodos de análisis. En general, es suficiente con seleccionar la columna que abarque el rango de pesos moleculares apropiado y un solvente que disuelva y solvate adecuadamente al analito. En la SEC, toda la muestra eluye antes de Vt o en Vt, y no existe la posibilidad (en un ensayo bien diseñado) de que quede retenido en la columna durante un tiempo mayor. Por este motivo, la capacidad de picos está muy limitada, y obviamente, no tiene sentido el gradiente de elución que ampliaba esta capacidad en otros modos cromatográficos. Resulta claro que es el método más predecible, ya que todos los constituyentes de la muestra deben eluir entre el volumen de exclusión y el volumen de permeación total.

Si bien la operación en SEC aparenta ser bastante sencilla, en la práctica, suelen presentarse algunas dificultades. Por un lado, el cálculo del peso (o distribución) molecular de un polímero es una operación bastante compleja, aunque los integradores modernos disponen de algoritmos para el tratamiento adecuado de este problema. Por el otro, las adsorciones a los materiales de relleno que suelen presentar algunos biopolímeros complican bastante la interpretación de los cromatogramas. Todo mecanismo ajeno a la exclusión (adsorción, partición, intercambio iónico) debe ser evitado por una elección adecuada de la fase movil.

Entre las ventajas de la SEC podemos enumerar las siguientes:

- Separación por dimensión molecular, válida no sólo para el análisis directo sino como método preliminar de fraccionamiento de muestras complejas, para su posterior estudio por otros métodos.
- Picos angostos. Como el volumen de elución es pequeño, no mayor del volumen de exclusión, la dispersión es baja y la detectabilidad alta.
- Tiempos de separación cortos y predecibles, pues toda la muestra eluye antes o en el volumen de exclusión.
- Elución predecible, en base a su peso (dimensión) molecular.
- No hay pérdida de muestra, ya que no existe interacción con la fase estacionaria.
- No hay desactivación de la columna, pues en ella no se acumulan impurezas por fenómenos químicos de retención aunque puede, por supuesto, bloquearse mecánicamente con partículas si se inyectan muestras sin filtrar o que precipiten en contacto con la fase móvil, o bien sufrir disolución de lecho según la naturaleza de su matriz, tipo de solvente, condiciones operativas, etc).

La SEC no está, sin embargo, libre de algunas desventajas, entre ellas:

- Limitada capacidad de picos, típicamente no más de 10 o 12, ya que todos deben eluír entre Vt y Vo.
- Incapacidad de resolver muestras de peso (dimensión) molecular similar.
- La resolución no puede manipularse. La elección de la fase móvil sólo tiene por objeto

evitar la interacción muestra-fase estacionaria, y no existe la "selectividad" disponible en otros métodos como variable de ajuste. El único modo de aumentar la resolución es el aumento de la longitud de la columna (o acople de varias columnas). El efecto de la temperatura debe tomarse con cuidado, ya que influye sin duda sobre la dimensión de la molécula.

8.2 Mecanismo de la Separación

El mecanismo de separación de la SEC es el de la **exclusión estérica** (denominada también exclusión por tamaño) propuesto por Flodin[5] en el año 1962 y que fue posteriormente ampliado[6] (exclusión secundaria) por otros autores. En esta modalidad cromatográfica los solutos de mayor peso molecular se "retrasan" en una columna como consecuencia de su permeación en un gel cuyos poros están llenos con solvente. Es decir, que se trabaja en una columna cromatográfica operando en el volumen muerto.

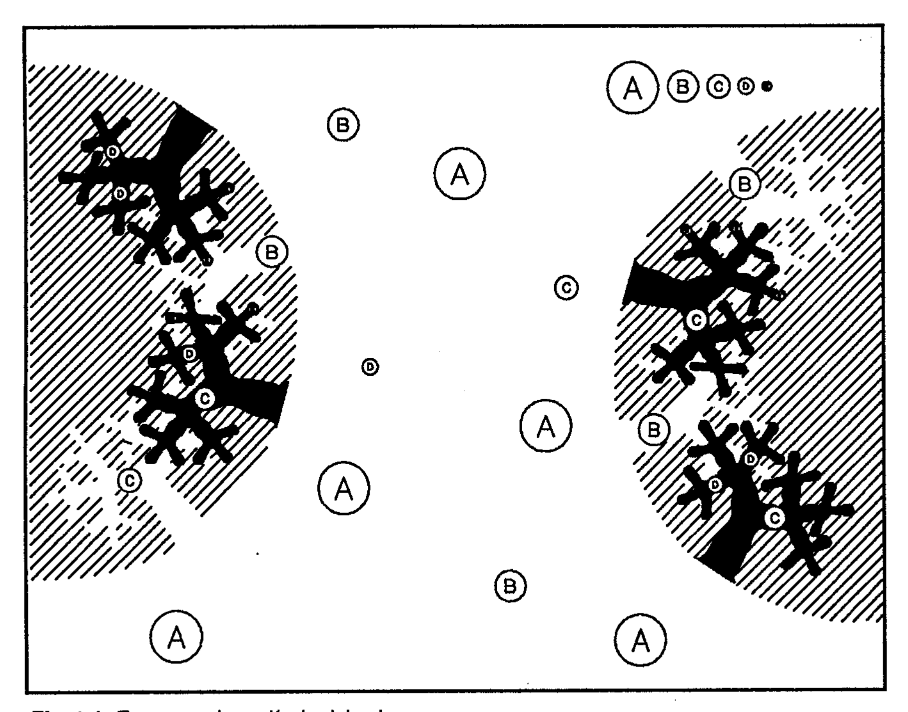


Fig. 8.1 Esquema de partícula del gel.

Una partícula de un gel está formada por un polímero con mayor o menor grado de entrecruzamiento (figura 8.1), con una gran cantidad de poros de diferentes tamaños. Según la teoría de exclusión estérica de Flodin[5] las moléculas a separar son esféricas y al aplicar solvente fluyendo, esas moléculas se mueven a través de la columna produciéndose la permeación dentro del gel. Como los canales entre las partículas son mucho mayores que los poros de las mismas, las moléculas grandes, que no pueden ingresar a los poros son excluídas, (figura 8.2) y viajan entre ellos. Estas moléculas no se retienen y eluyen a V_0, llamado **volumen inter-partículas.** Las moléculas de tamaño intermedio ingresan a los poros (figura 8.1) y migran a través de la columna tan rápido como su tamaño les permite, es decir, según la profundidad de penetración en los poros, separándose de acuerdo a su tamaño efectivo en solución en un proceso denominado **permeación selectiva** (figura 8.2). Las moléculas más pequeñas y las moléculas de solvente acceden a todos los poros (figura 8.1) por lo cual no se separan selectivamente y eluyen juntas en el **volumen de permeación total** V_t (figura 8.2). El volumen de permeación total es conceptualmente equivalente al volumen muerto de la cromatografía de afinidad. Dicho de otro modo, un volumen de columna es suficiente para lograr la elución de todas las sustancias en el cromatograma.

El volumen disponible en los poros, **volumen intra-partícula** V_i, resulta ser V_t - V_0. El volumen de retención de un compuesto determinado (V_R) está dado por la suma del volumen entre las partículas, y el volumen de los poros accesible a un tamaño molecular determinado. Es decir:

$$V_R = V_O + K_d V_i \qquad \textbf{(8-1)}$$

donde V_0 es el volumen intersticial del gel que es accesible a todas las moléculas, V_i es el volumen total de los poros de las partículas del gel que es accesible a las partículas más pequeñas, K_d es la coeficiente de distribución del soluto en el gel y puede calcularse:

$$K_d = \frac{V_R - V_o}{V_i} = \frac{V_R - V_o}{V_t - V_o} \qquad \textbf{(8-2)}$$

K_d es independiente de la temperatura, debido a que el proceso de exclusión está controlado por cambios entrópicos. Esta última condición se cumple en los materiales de relleno rígidos, pero no puede determinarse en los geles blandos debido a que éstos se modifican cuando cambia la temperatura. K_d se relaciona con k' de la cromatografía de afinidad (ecuación 3-5), y adopta valores que oscilan entre cero (exclusión total) y uno (permeación total).

- Si $K_d = 0$, $V_R = V_0$, es decir que el volumen de retención es igual al volumen entre las partículas y las sustancias eluyen en el volumen de exclusión. Comprende a las moléculas cuyo tamaño es mayor al de los poros del gel.

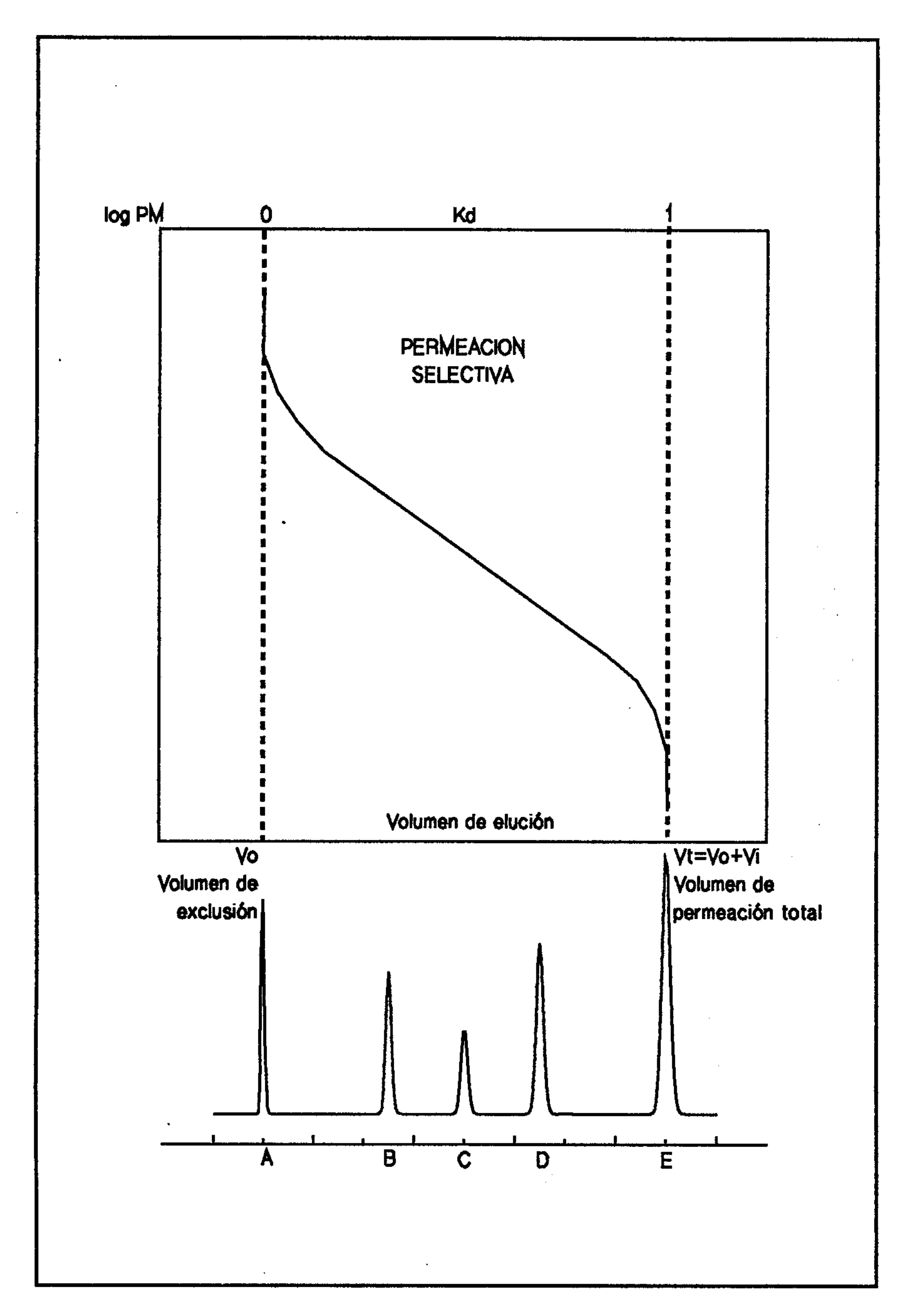


Fig. 8.2 Curva genérica de calibración.

- Si $K_d = 1$, $V_R = V_0 + V_i$. Comprende a las moléculas que eluyen en la zona de permeación total, es decir, aquellas cuyo tamaño les permite penetrar completamente en los poros del gel.
- Si $0 \leq K_d \leq 1$, las sustancias se separan selectivamente en la columna cromatográfica de acuerdo a su peso molecular, en el **rango de fraccionamiento** del gel.
- Si $Kd < 1$, significa que existen mecanismos de retención adicionales, diferentes de la exclusión molecular.

La separación (y la retención) en la cromatografía de exclusión molecular depende, como se ha dicho, del tamaño efectivo o radio molecular hidrodinámico del compuesto a analizar. El **radio molecular hidrodinámico** es el radio de migración del soluto dentro de la fase móvil, y depende de la geometría del polímero (esferas rígidas, hélices al azar, barras rígidas), y de la interacción de las moléculas del polímero entre sí y con la fase móvil. Como el radio molecular hidrodinámico se relaciona con el peso molecular de las sustancias, es posible construir una curva de calibración utilizando homólogos o sustancias con comportamientos similares e interpolar el tiempo de retención de una sustancia de peso molecular desconocido. Una curva de calibración (como la ejemplificada en la figura 8.2) no es perfectamente lineal en sus extremos debido a que los poros no son absolutamente uniformes en tamaño. Debe evitarse toda interacción analito-fase estacionaria (propia de los modos de afinidad), ya que en este caso, el cálculo de peso molecular no puede llevarse a cabo. En algunos casos se observan picos con volúmenes de retención mayores a $V_0 + V_i$. Este hecho es completamente inconsistente con la teoría planteada, e indica indudablemente la existencia de algún fenómeno de retención por afinidad (partición, adsorción) entre la superficie del poro y el polímero en análisis. Esta situación aparece aisladamente en la determinación de polímeros sintéticos y elastómeros por GPC, pero suele ser habitual en la determinación de biopolímeros por GFC. En este caso debe modificarse la fase móvil por ajuste del pH, de la fuerza iónica o por agregado de aditivos, ya sea para evitar la disociación de los grupos ionizables del analito o bien de los sitios activos del relleno.

8.3 La Fase Estacionaria

Materiales de Relleno

Geles Blandos

Los dextranos fueron desarrollados e introducidos por Flodin y Porath y han tenido amplia difusión para el análisis de biopolímeros, aunque no pueden utilizarse en HPLC

debido a que su bajo grado de entrecruzamiento los hace lábiles frente a las presiones de trabajo. Los dextranos son geles blandos que tienen muy baja resistencia mecánica y se emplean en columnas largas a muy bajas presiones y con caudales moderados (no mayores a 1 ml/min). Además de los dextranos, existen otros materiales hidrofílicos como poliacrilamida, polisacáridos y agarosas que se utilizan para la separación de polímeros solubles en agua. En general, poseen tamaños de partículas superiores a los geles rígidos (unos 50 μm) y no pueden utilizarse en HPLC porque el caudal y la alta presión generada provocan deformación de partículas y producen canales y grandes volúmenes muertos. Su presión límite es de unas 20 psi, y su máxima velocidad lineal 25 cm/h. Algunos materiales son más resistentes, por ejemplo el Sephadex LH 20 y G 25 que se utilizan con fases móviles acuosas. Estos materiales resisten presiones de hasta unas 200 psi.

Los geles blandos poseen un poder de hinchamiento muy elevado, son capaces de absorber varias veces su peso en solvente, no poseen poros permanentes y su porosidad está directamente relacionada con su capacidad de hinchamiento. A su vez, esta capacidad de hinchamiento está íntimamente relacionada con el tamaño de poro del gel. Cuanto menor sea el tamaño de poro, mayor será la capacidad de hinchamiento y consecuentemente mayor será la fragilidad del gel. En la tabla 8.I se listan los geles blandos de uso más común.

Geles Semirrígidos

Los geles del tipo semirrígido denominados también geles macroporosos, (tabla 8.II), están constituidos por polímeros con un elevado grado de entrecruzamiento. Su poder de hinchamiento es mucho menor que el de los materiales blandos (típicamente absorben 1

Material	Nombre Comercial	Rango de Pesos Moleculares
Dextranos	Sephadex TSK Tipo H	100 - 600.000 (Proteínas) 100 - 200.000 (Polisacáridos)
Poliacrilamida	Bio-Gel P	100 - 400.000 (Proteínas)
Agarosa	Bio-Gel A Sepharose	10^4 - 10^7 (Proteínas) 10^4 - 10^7 (Polisacáridos)
Dextrano-Acrilamida	Sephacril	5000- 10^6 (Proteínas)
Agarosa Entrecruzada	Sepharose CL	10^4 - 10^6 (Proteínas) 10^4 - 10^6 (Polisacáridos)

Tabla 8.I. Geles Blandos

ó 2 veces su volumen en solvente), poseen poros permanentes y son estables mecánicamente. A temperaturas elevadas pierden su resistencia mecánica y se degradan más rápidamente que a temperatura ambiente. Este hecho resulta ser de vital importancia en el análisis de poliolefinas donde se hace necesario (por solubilidad) trabajar a temperaturas elevadas.

Existen dos tipos de geles semirrígidos: los de poliestireno-divinilbenceno convencionales, incompatibles con agua y solventes polares como metanol y acetona, y los geles hidrofílicos con los que pueden utilizarse solventes acuosos como fase móvil.

Geles Rígidos

Los materiales de relleno rígidos son materiales inorgánicos, típicamente vidrios porosos y sílica porosa que se asemejan más a vidrios que a geles, aunque por analogía con los anteriores se los continúa llamando geles. Estos materiales son estables a altas temperaturas, poseen una distribución de poros estrecha y bien definida y sus permeabilidades son independientes de la presión. Se comercializan sin tratar (tabla 8.III) o modificados[7,8] (tabla 8.IV). Los materiales modificados poseen grupos químicamente unidos a la sílice (como se describió en la sección 5.2 para la fase reversa) a los efectos de disminuir la adsorción de los analitos debido a efectos secundarios de retención. No sufren procesos

Material	Nombre Comercial	Rango de Pesos Moleculares
Poliestireno	μStyragel TSK Tipo H Shodex HSG	100 - 10^6 (Poliestireno)
Copolímero de poliéter hidroxilado	TSK Gel PW Bio Gel TSK Spherogel PW Micropak TSK PW	1000 - 10^6 (Polisacáridos) 100 - 10^6 (PEGs)
Poli-2-hidroxietil-metacrilato	Spheron	20000 - 10^6 (Polisacáridos)
Poliestireno sulfonado hidroxilado	Shodex Ion-pak	$< 5.10^6$ (Polisacáridos)

Tabla 8.II. Materiales de relleno semirígidos.

de hinchamiento, son muy estables térmica y mecánicamente y pueden regenerarse fácilmente. Las características de los materiales de relleno rígidos se detallan en la literatura[9]. Estos materiales pueden utilizarse tanto con solventes acuosos como orgánicos. Su principal desventaja reside en que, en medios acuosos suelen presentar fenómenos secundarios de retención ya sea debido a interacciones de tipo iónico con los grupos hidroxilo activos o bien, en los materiales de relleno enlazados, por fenómenos de fase reversa. Estos últimos pueden minimizarse por el agregado de un solvente orgánico a la fase móvil. Otra desventaja de estos materiales es la solubilización que presenta la sílice en medios acuosos, especialmente a valores de pH mayores que 7.5.

Material	Nombre Comercial	Rengo de Pesos Moleculares
Sílica Porosa	LiChrospher Fractosil Porasil Spherosil Zorbax	100 - 10^6
Vidrios Porosos	CPG	100 - 10^6 (poliestireno) 1000 - 10^6 (polisacáridos) 3000 - 10^6 (proteínas)

Tabla 8.IIII. Materiales rígidos de relleno.

Material	Fase Enlazada	Nombre Comercial	Rengo de Pesos Moleculares
Sílica Porosa	Diol	LiChrosorb Diol LiChrospher Diol Bio-Sil GFC SynChropak GPC Glycophase CPG	10^3 - 10^7 (Polisacáridos) 5000 - 500.000 (Proteínas)
Sílica Porosa	Poliéter	μBondagel	500 - 10^6 (Polisacáridos)
Sílica Porosa	——	Columna de Proteínas	500 - 10^5 (Proteínas)
Sílica Porosa	——	TSK Gel SW	100 - 10^5 (PEGs)

Tabla 8.IV. Materiales de relleno rígidos de fase ligada

Las Columnas de Exclusión

Las columnas clásicas de SEC tienen habitualmente 25 a 30 cm de longitud, 0.4 hasta 0.8 cm de diámetro interno, y se rellenan con partículas de 4 a 10 µm de diámetro. Dada la baja capacidad de picos por cromatograma de esta modalidad cromatográfica, la eficiencia de la columna tiene mayor importancia relativa que en el caso de la cromatografía de afinidad. Como en el caso de cromatografía de afinidad, la eficiencia de las columnas se mide en función del número de platos teóricos (ecuación 3-10), y como en aquel caso, a menor tamaño de partículas corresponde mayor eficiencia. Así por ejemplo, una columna de 10 µm de tamaño de partícula tiene una eficiencia mayor a 20.000 platos/m, mientras que una columna rellena con un gel blando, con un tamaño de partícula de 50 µm tiene una eficiencia[10] de 1500 platos/m.
La eficiencia de la columna determina, como se ha visto, la capacidad de picos del cromatograma[11]:

$$\mathbf{n = 1 + 0.2\sqrt{N}} \qquad \textbf{(8-3)}$$

donde n es el número de picos en una mezcla que puede resolverse en una única corrida cromatográfica y N es la eficiencia de la columna. Así, para un valor N de 3000, pueden separarse por SEC hasta 12 picos. El empleo de partículas de menor diámetro resultará en el incremento de esta capacidad.
El tamaño de los poros del gel es el parámetro que determina el rango de pesos moleculares que éste es capaz de separar. Si el rango de pesos moleculares que se desea abarcar es muy grande es posible utilizar varias columnas de diferente grado de porosidad colocadas en serie. Este hecho, que no suele utilizarse en cromatografía de afinidad, es muy común en cromatografía de exclusión. En este caso, como los volúmenes de retención son aditivos, la curva de calibración global puede obtenerse simplemente adicionando las curvas de calibración de las columnas individuales. En este caso también sería posible juntar, en una misma columna, materiales de diferentes porosidades, aunque esto puede resultar en una disminución de la eficiencia de la columna.
Asimismo, si el rango de pesos moleculares que se desea abarcar es pequeño pero las sustancias a separar tienen pesos moleculares muy próximos, es posible utilizar varias columnas de igual porosidad.
Si se desea determinar con exactitud el peso molecular de una sustancia es necesario que la curva de calibración sea lo más recta posible. En el caso de emplear columnas acopladas, deben combinarse columnas que posean una distribución de tamaños de poro del tipo **bimodal**. Esto puede lograrse escogiendo columnas cuyas rectas de calibración individuales sean paralelas entre sí. Se obtienen distribuciones paralelas cuando los materiales de relleno de ambas columnas poseen sólo dos tamaños de poro discretos (bimodales), con una relación de 10:1 entre ambos tamaños de poro y ambas poseen distribuciones de poro moderadamente estrechas[12,13]. Mori[14] postuló que el grupo de

columnas a utilizar debe elegirse de modo tal que el límite de exclusión del grupo de columnas sea aproximadamente 10 veces el valor del peso molecular del polímero a medir.

8.4 La fase móvil

A diferencia de las modalidades cromatográficas de afinidad, en SEC la resolución no depende de la naturaleza de la fase móvil sino de la eficiencia de la columna y de la pendiente de la curva de calibración. A pesar de ello, la fase móvil no es un simple vehículo inerte de los solutos disueltos sino que debe cumplir ciertos requisitos: debe ser un "buen" solvente para el polímero, no presentar soluciones de polímero demasiado viscosas y evitar los fenómenos de retención secundaria. Además, debe ser compatible con el material de relleno de la columna y humectar bien la superficie del gel. Así, por ejemplo, no deben utilizarse fases móviles acuosas a valores de pH mayores que 7.5 en las columnas de sílice o de sílice enlazada porque la disuelven, especialmente si la temperatura o la fuerza iónica son elevadas, ni deben utilizarse solventes polares como los alcoholes o la acetona en columnas de poliestireno. En el caso de los geles blandos se requiere además, que el solvente utilizado tenga capacidad de hinchar al gel. En general, la compatibilidad relleno - solvente de elución se detalla ampliamente en la información que el fabricante de columnas provee con éstas.
La adsorción de una sustancia al material de relleno puede detectarse fácilmente, debido a que eluye después del volumen de exclusión. Con frecuencia las columnas de GFC, es decir, las empleadas con fases móviles acuosas, son las que presentan mayores problemas de adsorción de solutos al material de relleno. La sílice por ejemplo contiene grupos silanol, de naturaleza acídica, que pueden actuar como intercambiadores de cationes. La poliacrilamida y los dextranos por su parte presentan una pequeña cantidad de grupos carboxilo que pueden actuar de la misma forma. El modo más simple de evitar estas interacciones es controlando el valor del pH o de la fuerza iónica de la fase móvil, tratando de suprimir esa disociación. Igualmente, el agregado de sustancias que "bloqueen" los sitios activos (DMA, TMA), como se describirá para la fase reversa en la sección 11.1 suele dar buenos resultados. Otro fenómeno de adsorción es la retención en columnas fase ligada debido a mecanismos de fase reversa. Este fenómeno puede suprimirse agregando solventes orgánicos a la fase móvil, por ejemplo metanol.
La viscosidad del solvente es crítica para la separación, debido a que solventes con altas viscosidades dificultan la transferencia de masa entre las fases móviles y estacionaria, es decir empeoran la resolución. Esta consideración que resulta válida para cualquier modalidad cromatográfica tiene en la cromatografía de exclusión una importancia fundamental debido a que las macromoléculas de por sí tienen bajos coeficientes de

difusión.

Adicionalmente, el solvente a utilizar para la preparación de la fase móvil debe ser compatible con el detector. En GPC el detector por excelencia es el de índice de refracción por lo cual no existen demasiadas limitaciones en cuanto a ese factor. En GFC el detector puede ser de índice de refracción (polisacáridos) o ultravioleta (proteínas, péptidos, nucleótidos). En el último caso deben evitarse solventes con alta absorción ultravioleta en la región empleada del espectro.

ELUYENTE	USO	TEMPERATURA
THF	General Varios polímeros y oligómeros	Ambiente a 40°C
o-Diclorobenceno	Poliolefinas	130 - 150°C
1,2,4,triclorobenceno	Poliolefinas	130 - 150°C
Tolueno	Cauchos y elastómeros	Ambiente a 90°C
m-cresol	Poliamidas Poliésteres	100°C
Cloroformo	Siliconas, resinas epoxi	Ambiente
Dimetilformamida	Poliuretanos, acrilonitrilo	Ambiente a 100°C
Trifluoroetanol	Poliamidas	Ambiente a 40°C
Agua	Polímeros biológicos CMC, gelatina, poliacrilatos polidextranos, poliglicoles poliacrilamida, pulpa de pa- pel, polisacáridos	Ambiente a 90°C

Tabla 8.V. Eluyentes más comunes en cromatografía de exclusión

8.5 Cromatografía de Permeación por Geles

La cromatografía de permeación por geles (GPC) se utiliza para el análisis de polímeros sintéticos y elastómeros y tiene su origen en el año 1964, con los trabajos de J. Moore[2] de la Dow Chemical Co. Se diferencia de la cromatografía de filtración por geles (GFC) sólo en el tipo de sustancias analizadas y en el vehículo empleado como fase móvil. En GPC la fase móvil por excelencia es el tetrahidrofurano debido a que resulta ser un buen disolvente de la mayoría de los plásticos. Existen algunos polímeros de alto peso

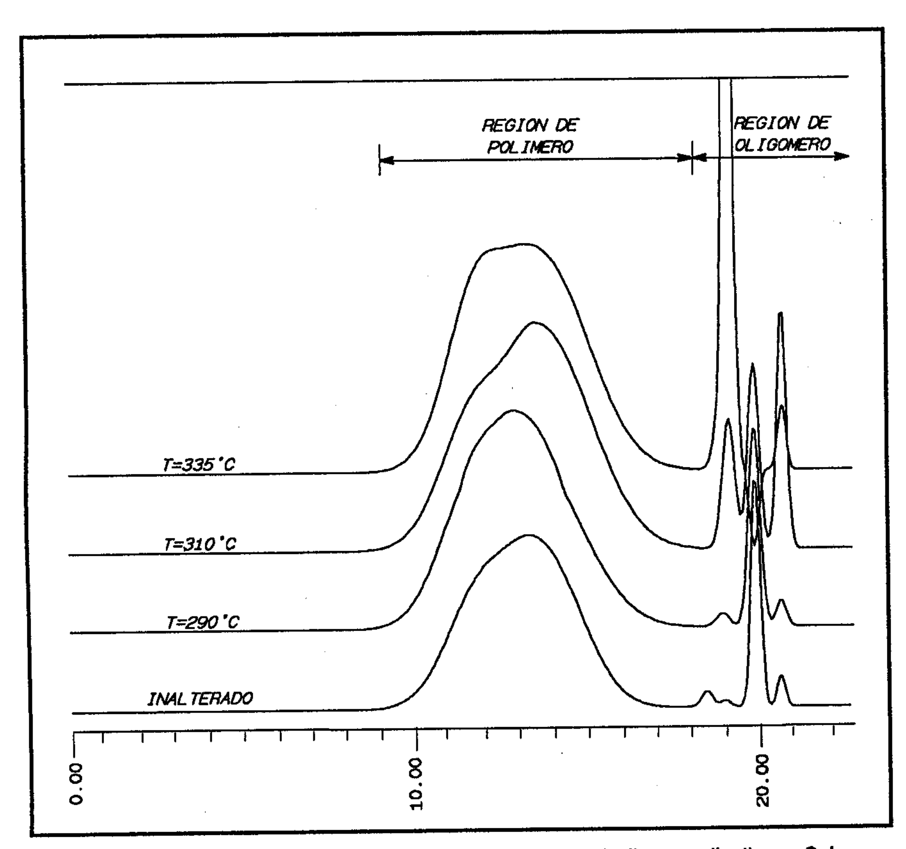


Fig. 8.3 Análisis GPC de un copolímero de óxido 2,6 polidimetilfenileno y poliestireno. Columna: PLGel 5µm, 10^8 Å, y 10^4 Å, Fase móvil: THF, Caudal: 1 ml/min, Temp:40 °C, Detector: UV 254 nm. De referencia 35 con permiso del editor.

molecular, poliolefinas (polietileno) y poliamidas (nylon), que no se disuelven a temperatura ambiente, pero lo hacen a mayor temperatura (100 - 150°C).

La cromatografía de permeación por gel tiene su principal (y amplia) aplicación en la industria plástica, donde se emplea para evaluar la distribución de pesos moleculares de polímeros. También se la utiliza para la determinación de oligómeros, monómeros y aditivos no poliméricos que eventualmente pudieran estar presentes junto con el polímero principal y para el cálculo de pesos moleculares de los oligómeros[16]. La determinación de la distribución de pesos moleculares es sumamente importante porque de ella dependen las principales propiedades físicas del polímero. Por otra parte, la GPC puede utilizarse para predecir el comportamiento de un polímero frente a la temperatura. Así, Unger[35] determinó la influencia de la temperatura en las propiedades físicas de un copolímero de óxido de 2,6 polidimetilfelineno y poliestireno tal cual se presentan en el proceso de elaboración del polímero por fusión (ver figura 8.3).

Como en la cromatografía de afinidad, el volumen de inyección debe mantenerse dentro de ciertos límites para evitar el ensanchamiento de banda extracolumnar y la concentración de analito debe mantenerse baja para operar en la zona lineal de la isoterma de distribución. En GPC, existe también otro factor limitante. Ese factor es la viscosidad de las muestras a inyectar, esta viscosidad se relaciona con el peso molecular del polímero a analizar. En la tabla 8.VI se indican los volúmenes recomendados de inyección en función del peso molecular del polímero a analizar.

En la figura 8.4 se ilustra un cromatograma típico de GPC, que representa la distribución de pesos moleculares de polibutadientereftalato. Puede observarse que el pico obtenido es ancho, aunque el ensanchamiento del pico en la cromatografía de exclusión molecular tiene implicancias diferentes a las de la cromatografía de afinidad. En el último caso el ensanchamiento total de la banda cromatográfica (σ^2_t) está dado por el ensanchamiento

Rango de Pesos Moleculares	**Concentración de la muestra %**
Hasta 20.000	0.25
34.000 - 200.000	0.10
400.000 - 2.000.000	0.05
más de 2.000.000	0.01

Tabla 8.VI Máxima concentración de la muestra a inyectar en una columna de Styragel versus su peso molecular. Gentileza de Waters Assoc.

intracolumnar (σ^2_{col}), más el ensanchamiento extracolumnar, es decir, el producido entre el inyector y la celda, descontando el debido a la columna (σ^2_{ext}). En SEC se debe agregar un componente adicional, debido a la variación en la distribución de pesos moleculares de la sustancia a determinar (σ^2_{pol}), es decir:

$$\sigma^2_t = \sigma^2_{col} + \sigma^2_{ins} + \sigma^2_{pol} \qquad \textbf{(8-4)}$$

Knox y col[16] estudiaron estos fenómenos de ensanchamiento de banda concluyendo que el principal responsable del ensanchamiento observado es la propia dispersión de pesos moleculares del polímero en cuestión.

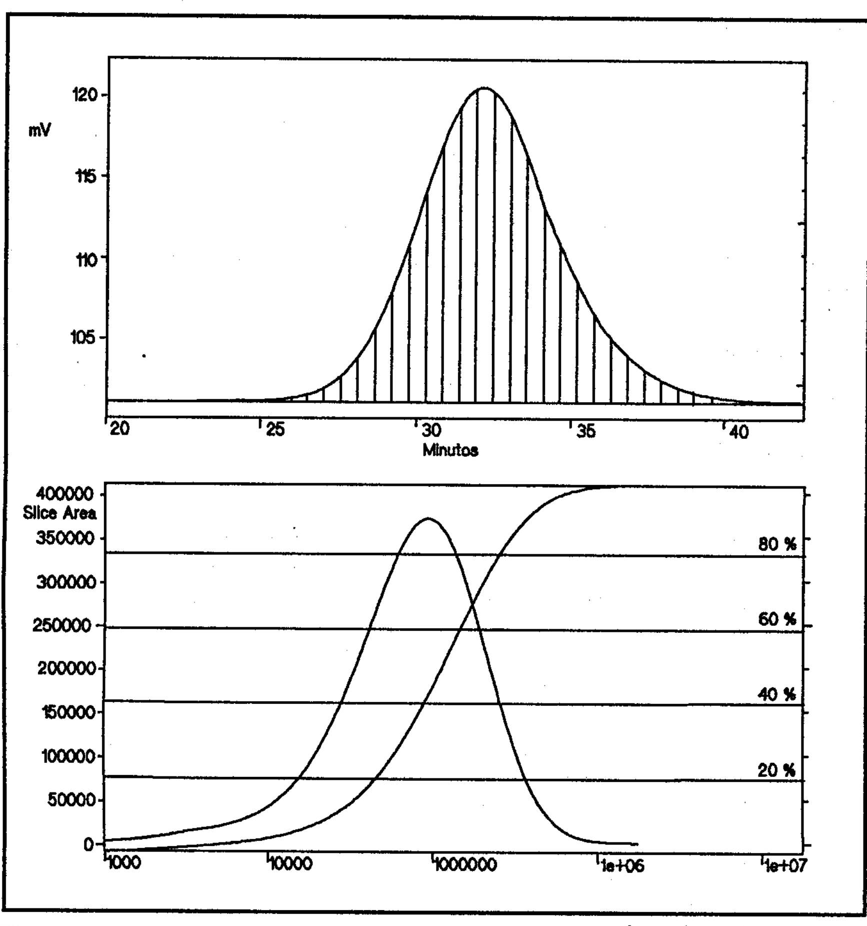


Fig. 8.4 GPC de polibutadientereftalato. Columna: Ultrastyragel 10^5 Å, 10^4 Å, 10^3 Å, 500 Å, Fase móvil: metacresol, Caudal: 1 ml/min a 100 °C, Detector RI. De referencia 35 con permiso del editor.

intracolumnar (σ^2_{col}), más el ensanchamiento extracolumnar, es decir, el producido entre el inyector y la celda, descontando el debido a la columna (σ^2_{ext}). En SEC se debe agregar un componente adicional, debido a la variación en la distribución de pesos moleculares de la sustancia a determinar (σ^2_{pol}), es decir:

$$\sigma^2_t = \sigma^2_{col} + \sigma^2_{ins} + \sigma^2_{pol} \tag{8-4}$$

Knox y col[16] estudiaron estos fenómenos de ensanchamiento de banda concluyendo que el principal responsable del ensanchamiento observado es la propia dispersión de pesos moleculares del polímero en cuestión.

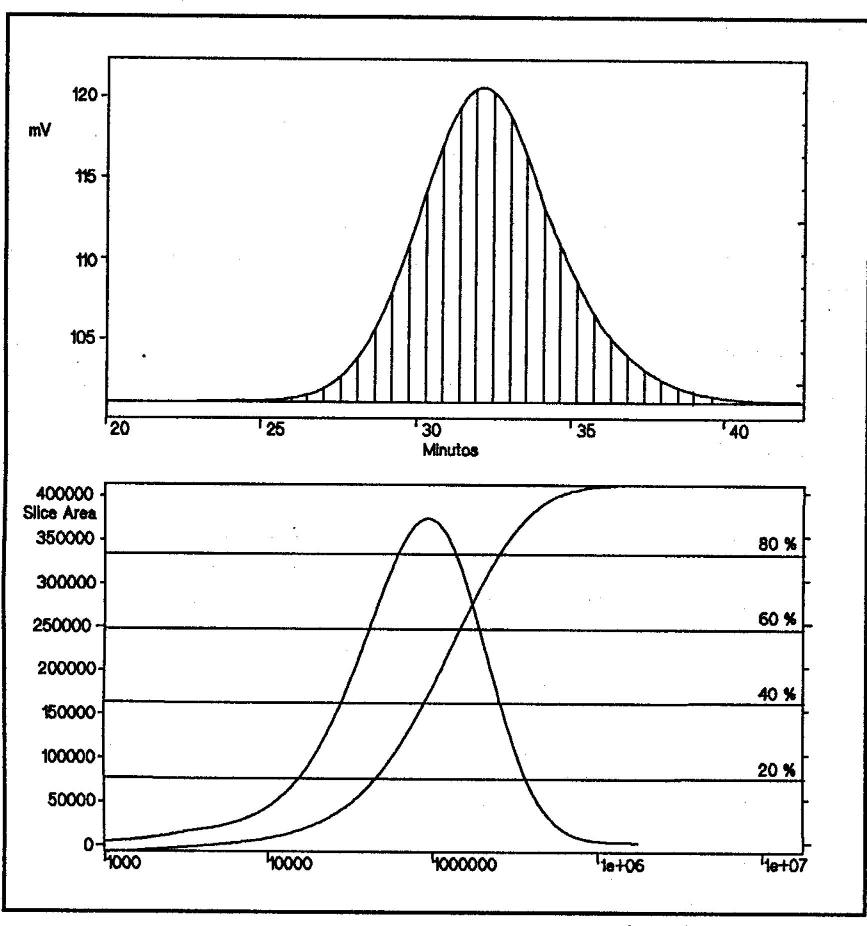


Fig. 8.4 GPC de polibutadientereftalato. Columna: Ultrastyragel 10^5 Å, 10^4 Å, 10^3 Å, 500 Å, Fase móvil: metacresol, Caudal: 1 ml/min a 100 °C, Detector RI. De referencia 35 con permiso del editor.

8.6 Cromatografía de Filtración por Geles

La cromatografía de filtración molecular (GFC), como fue mencionado en la sección 8.1, es una modalidad de la SEC que se ocupa de la separación de polímeros biológicos solubles en agua o en solventes polares. Las columnas de poliestireno-DVB empleadas para el análisis de polímeros sintéticos y elastómeros no resisten a los solventes polares por lo cual no pueden utilizarse como material de relleno para las columnas de la GFC. Por su parte, los materiales rígidos como la sílica poseen grupos silanol que pueden causar adsorciones indeseadas y desnaturalizar biopolímeros, especialmente las proteínas más lábiles[17]. Los grupos silanol presentes en la sílice son intercambiadores catiónicos débiles a valores de pH mayores que 4.5. Estos grupos interactúan con grupos funcionales básicos de las moléculas, y retienen por mecanismos de afinidad. Sin embargo, la modificación química de la superficie la silicagel con organoclorosilanos produce fases estacionarias apropiadas para la exclusión de polímeros hidrosolubles[18]. De todos modos, siempre persisten algunos grupos silanol libres (sin ligar al modificador de la superficie), y su interacción con los solutos inyectados debe minimizarse. Para tal fin se utilizan fuerzas iónicas elevadas, bajos valores de pH o agregado aditivos (aminas como TEA, DMA, etc). Chang y col[19] demostraron que prácticamente no existe adsorción de biopolímeros a materiales de relleno de sílice enlazada a grupos diol. Estos materiales pueden utilizarse tanto en la cromatografía de exclusión analítica como semipreparativa. Roumeliotis y Unger[20] inyectaron una mezcla de proteínas que diferían en peso molecular en un factor 2 en una columna de fase ligada tipo diol y lograron aislarlas en una sola corrida.

De acuerdo a Wehr y Abbot[21], los materiales de relleno de las columnas para utilizar en GFC deben cumplir con los siguientes requisitos:

- Deben ser predominantemente hidrofílicas. Interacciones de tipo hidrófobo pueden adsorber o desnaturalizar a las proteínas.
- Deben poseer un tamaño de poro suficientemente grande como para permitir la permeación de las macromoléculas. Como regla general el tamaño de poro del material de relleno de la columna debe ser varias veces mayor que el eje mayor de la macromolécula.
- Deben poseer una superficie inerte para evitar adsorciones.
- Deben poseer resistencia mecánica.
- Su geometría debe permanecer invariable frente a cambios de fase móvil, pH o fuerza iónica.
- Deben ser estable en una amplia gama de valores de pH.

La GFC ha sido empleada para el análisis y la determinación de pesos moleculares de diversas sustancias de interés biológico como los polímeros derivados de la glucosa[22-30]

(dextranos, maltodextrinas, cellodextrinas, gentodextrinas), de la celulosa[42] (carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilhidroxietilcelulosa), polietilenglicoles[27,30], péptidos[31], proteínas[21,27,32,33] y ácidos nucleicos[36]. También ha sido utilizada para la determinación de colesterol unido a lipoproteínas[34] (HDL y LDL).

La determinación del peso molecular de un biopolímero es una operación bastante común en la bioquímica. Para su determinación pueden utilizarse los cálculos que se indicarán en la sección 8.7. Los polímeros derivados de la glucosa, celulosa y los polietilenglicoles no suelen presentar adsorción a los materiales de relleno químicamente unidos por lo cual puede utilizarse agua como fase móvil, sin aditivos o con el agregado de azida sódica al 0.02 % como bacteriostático[28] y con detectores de índice de refracción, dada su baja absorción UV. En la figura 8.5 se ilustra la distribución de pesos moleculares de dos dextranos diferentes.

Las proteínas y péptidos suelen presentar mayores interacciónes, siendo éstas últimas altamente dependientes del pH y de la fuerza iónica. Por esta razón, suelen emplearse buffers como fase móvil. En la figura 8.6 se ilustra la separación de estándares de peso molecular de proteinas. Si el pH de la fase móvil está en las proximidades del punto isoeléctrico, la proteína no tendrá carga alguna y la retención estará gobernada por interacciones hidrófobas con el material de relleno de la columna, mientras que a valores de pH menores que el punto isoeléctrico la presencia de cargas positivas en la proteína

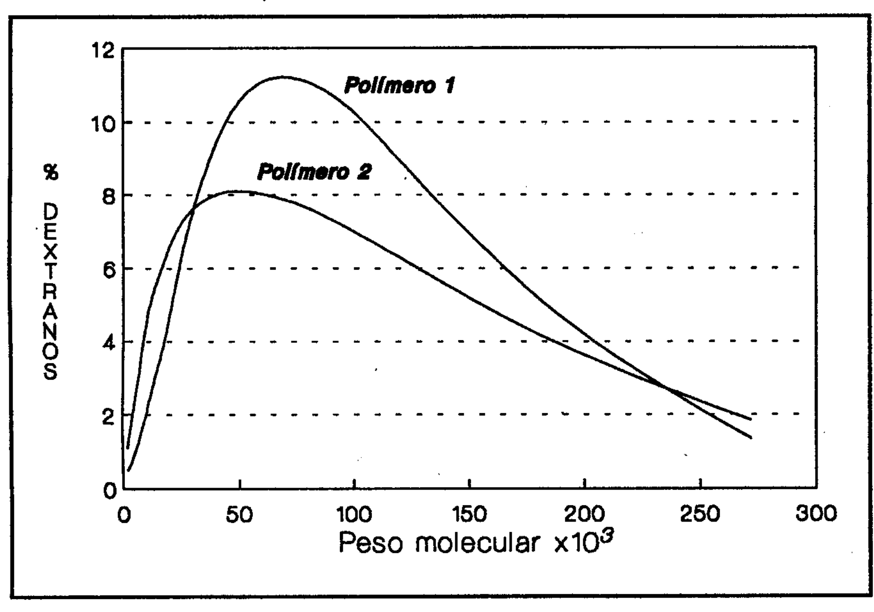


Fig 8.5 Distribución de pesos moleculares de dos dextranos diferentes utilizando 2 columnas de Bondagel E-500 en serie. Fase móvil: agua con azida sódica al 0.1 % como bacteriostático a 1.0 ml/min. Detector de índice de refracción.

favorecerá el intercambio iónico con los grupos silanol de la columna. Con frecuencia, la determinación del peso molecular de estas sustancias se efectúa con el agregado de un desnaturalizante, por ejemplo dodecilsulfato, con el objeto de destruir su estructura terciaria.

La detección de péptidos y proteínas se efectúa a 210 nm (absorción de la unión peptídica) o a 280 nm (absorción de los grupos fenilalanina y triptofano presentes en la molécula). Shioka y col[31] evaluaron 50 péptidos con una fase móvil conteniendo un buffer de fosfatos pH 7.4 0.15 M, cloruro de sodio 1 M, 20 % de metilcellosolve y 1 % de dodecilsulfato de sodio con el objeto de determinar sus pesos moleculares y compararlos con los valores reales obtenidos por otros métodos. Estos autores concluyeron que existe una buena correlación entre los resultados experimentales y los valores aceptados como referencia para los péptidos en cuestión excepto en dos grupos: uno de ellos presentaba mayores tiempos de retención que los esperados debido a mecanismos de adsorción (angiotensina e insulina) mientras que el otro presentaba tiempos de retención menores a los esperados, aunque por mecanismos desconocidos. Los autores estiman que es posible determinar el peso molecular de péptidos en el rango de 200 - 10.000 daltons con un error de aproximadamente ± 20 %.

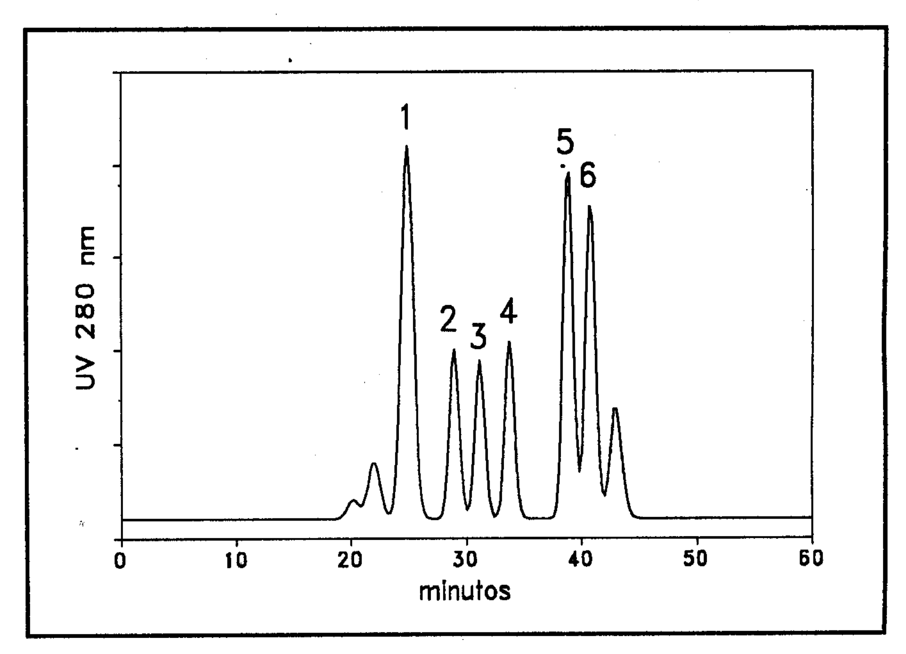


Fig 8.6 · Separación de estándares de peso molecular de proteínas en GFC. Columna: en serie 2 TSK G3000 SW. Fase móvil: buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.8 a 0.5 ml/min. Detector UV a 280 nm. Los picos corresponden a (1) Ferritina, (2) Aldolasa, (3) Seroalbúmina, (4) Ovoalbúmina, (5) Quimotripsinógeno A y (6) Citocromo C.

8.7 Cálculo del Peso Molecular

Peso Molecular y Distribución de Pesos Moleculares

Un polímero está formado por unidades que se repiten en cadenas. La variabilidad en la longitud de la cadena de un polímero sintético se genera en el proceso de producción, debido a variables termodinámicas y cinéticas. Por esta razón, en este caso no es posible definir un peso molecular único y debe indicarse tanto el peso molecular promedio como la **distribución de pesos moleculares.** Esa distribución es un parámetro de gran importancia para la industria plástica, porque la mayoría de las propiedades físicas del polímero depende de ella. La cromatografía de exclusión molecular es capaz de evaluar esa distribución y de determinar el **peso molecular medio numérico** (Mn), el **peso molecular medio ponderal** (Mw), el **peso molecular medio de centrifugación** (Mz) y la **dispersidad o polidispersidad** (D), propiedades que caracterizan apropiadamente a los polímeros. En esta sección detallaremos brevemente los diferentes modos para calcular estos parámetros. Una descripción más detallada puede encontrarse en la literatura[37]. Es importante destacar que si bien los cálculos planteados se utilizan en el análisis de polímeros sintéticos y elastómeros, es posible utilizarlos para la determinación de los pesos moleculares de polímeros hidrosolubles, ya sean de peso molecular único o monodispersos como las proteínas, o de amplia distribución de tamaño molecular como los dextranos.

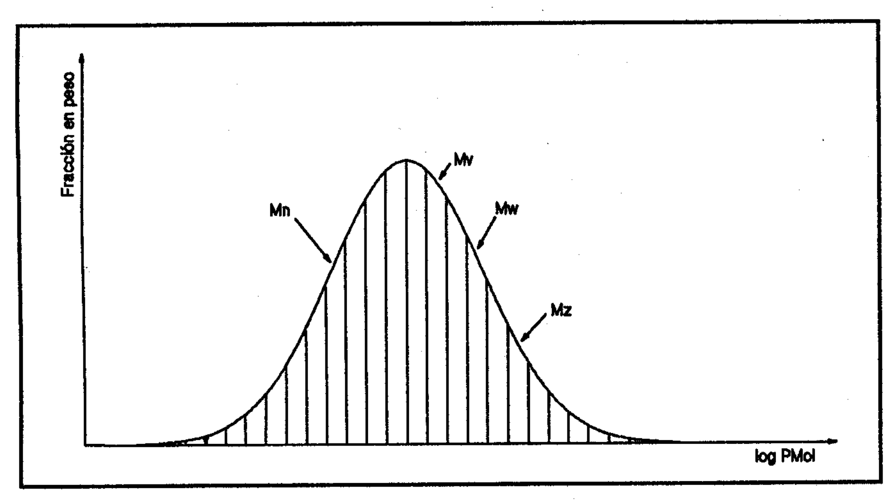


Fig. 8.7 Distribución genérica de pesos moleculares de un polímero.

La figura 8.7 ilustra una distribución de pesos moleculares genérica de un polímero. Si llamamos "i" a una fracción del polímero, N_i al número de moléculas presentes en la fracción i, W_i a la fracción en peso del componente i y M_i al peso molecular de la fracción del componente i, W_i será igual al producto de N_i por M_i, ΣN_i al número total de moléculas del polímero, y ΣW_i al peso total del polímero en estudio.
Puede deducirse que existen dos modalidades diferentes para promediar el peso molecular, una de ellas resulta de tomar el peso total de la muestra en estudio y dividirla por el número de moléculas contenida en ella, este tratamiento dará origen a Mn, peso molecular medio numérico, es decir:

$$Mn = \sum \frac{N_i}{\Sigma N_i} M_i = \frac{\Sigma N_i M_i}{\Sigma N_i} \qquad (8\text{-}5)$$

En principio, cualquier metodología que mida una propiedad coligativa (determinación del grupo terminal, osmometría, crioscopía, ebullometría) medirá Mn. Si las moléculas se seleccionan al azar y se clasifican en fracciones de acuerdo a su peso molecular se obtiene Mn. Mn es sensible a cambios en los pesos moleculares bajos del polímero. En la SEC, los integradores capaces de operar en GPC están programados para medir el área de las fracciones. Así, la fracción en peso W_i (producto de N_i por M_i) es en HPLC, A_i, área de la fracción i y la ecuación 8-5 puede transformarse en:

$$Mn = \frac{\Sigma A_i}{\Sigma \frac{A_i}{M_i}} \qquad (8\text{-}6)$$

El otro peso molecular resulta de sumar las fracciones en peso de cada especie y multiplicarla por el peso molecular de la fracción, este tratamiento dará origen al peso molecular medio ponderal, es decir:

$$Mw = \sum \frac{W_i}{\Sigma W_i} M_i = \frac{\Sigma W_i M_i}{\Sigma W_i} = \frac{\Sigma N_i M_i^2}{\Sigma N_i M_i} \qquad (8\text{-}7)$$

Este peso molecular también puede relacionarse con el área obtenida en una fracción de polímero en el HPLC, según:

$$Mw = \frac{\Sigma A_i M_i}{\Sigma A_i} \qquad (8\text{-}8)$$

Mw se ve muy influenciado frente a la presencia de fracciones de moléculas de alto peso

molecular. Depende no sólamente de la cantidad de moléculas de cada especie sino también del peso de cada una de las especies. Mw se determina por GPC o por dispersión de la luz (light scattering).
Existe un tercer peso molecular, Mz, que favorece aún más la presencia de las fracciones más pesadas. Este peso molecular se calcula:

$$Mz = \frac{\Sigma N_i M_i^3}{\Sigma N_i M_i^2} \qquad (8\text{-}9)$$

Mz es sensible a los más pesados de todas las fracciones y puede obtenerse por GPC o por centrifugación. Este peso molecular, también puede expresarse en función del área de HPLC, es decir:

$$Mz = \frac{\Sigma A_i M_i^2}{\Sigma A_i} \qquad (8\text{-}10)$$

La abundancia fracciones pesadas en el polímero es muy útil para muchas de sus propiedades físicas como ser la resistencia, módulo elástico, tensión de rotura y resistencia al desgarro. Finalmente, existe un cuarto peso molecular que se refiere a la viscosidad del polímero (Mv), y se calcula:

$$Mv = \left(\frac{\Sigma N_i M_i^{\alpha+1}}{\Sigma N_i M_i} \right)^{1/\alpha} \qquad (8\text{-}11)$$

Para un mismo polímero hay un único valor de Mn, Mw o Mz, pero Mv varía con el solvente y la temperatura. El valor de α se determina por viscosimetría.
La dispersidad de un polímero es el cociente entre Mw y Mn:

$$D = \frac{Mw}{Mn} \qquad (8\text{-}12)$$

Este cociente está vinculado con la desviación estándar de la distribución del siguiente modo:

$$D = 1 + \left(\frac{s}{Mn} \right)^2 \qquad (8\text{-}13)$$

Un polímero se denomina monodisperso, cuando $D < 1.1$, y se denomina polidisperso si $D > 1.1$. D puede tener diversos valores de acuerdo a los diferentes polímeros. Por

ejemplo, para polímeros sintéticos obtenidos por polimerización en cadena D toma los siguientes valores: 1.02 para los polímeros de iniciación aniónica, 2.0 a 5.0 para los iniciados por radicales libres, y adopta valores muy grandes para los polímeros ramificados al azar[37].

Curvas de Calibración

Calibración Simple

Para determinar el peso molecular de una macromolécula de peso molecular simple (por ejemplo una proteína), o un polímero de baja dispersión de pesos moleculares basta con correlacionar el volumen de elución del máximo del pico de la sustancia desconocida con una curva de calibración construída con polímeros estándar de baja dispersidad y pesos moleculares conocidos. El poliestireno se utiliza como estándar debido a que este polímero puede obtenerse fácilmente con una distribución de pesos moleculares bastante angosta. En el caso de polímeros polidispersos el cálculo es más complejo. En primer lugar se divide el polímero en fracciones, se determina el peso molecular que corresponde a cada fracción y la proporción en que se encuentra esa fracción en el total del polímero. El peso molecular de cada fracción se determina por comparación del volumen (o tiempo) de elución de las fracciones con los correspondientes a la curva de calibración. Así, utilizando las ecuaciones 8-6, 8-8, 8-10 y 8-11 es posible determinar cada uno de los pesos moleculares del polímero y su dispersidad.

Suelen presentarse grandes errores cuando se determina el peso molecular de un polímero utilizando como comparación una curva de calibración construida con estándares de otro polímero sustancialmente diferente. Esto se debe a que la separación está gobernada por el tamaño efectivo en solución, y los mismos suelen ser muy diferentes dependiendo del tipo de polímero a analizar. Sin embargo en muchos casos, especialmente en las tareas de control de la producción de diversos polímeros, no es necesario determinar su peso molecular con exactitud. Simplemente basta con comparar los perfiles obtenidos en la corrida HPLC, o cuantificar los diferentes pesos moleculares utilizando estándares de otro polímero (habitualmente poliestireno) a los efectos de asegurar la reproducibilidad en los lotes de producción. En el último caso puede indicarse que se han determinado los pesos moleculares del polímero en cuestión respecto del poliestireno.

Calibración Universal

Grubisic y col[38] propusieron que el volumen hidrodinámico V_h de un polímero se relaciona con su viscosidad intrínseca en la fase móvil de HPLC, y que éste puede utilizarse para generar una curva de calibración universal para todos los polímeros. El volumen hidrodinámico es proporcional al producto de la viscosidad intrínseca $[\eta]$ del polímero por su peso molecular (M). Para polímeros en hélice y globulares el volumen

hidrodinámico se relaciona con el producto de $[\eta]$ por (M) de acuerdo a la ecuación de Einstein:

$$[\eta]\, M = 2.5\, N_o V_h \tag{8-14}$$

donde N_0 es el número de Avogadro. Si el volumen hidrodinámico controla la separación de SEC, entonces un gráfico de $[\eta]$M frente al volumen de elución debiera ser equivalente para todos los polímeros. Existen desviaciones a esta calibración universal que dependen del polímero (concentración, estructura), de su concentración, del tipo de material de relleno de la columna, de los mecanismos de retención secundarios y de la naturaleza de la fase móvil.

Para determinar el peso molecular utilizando el sistema universal de calibración, primero se debe determinar el peso molecular relativo a un estándar de referencia de acuerdo a la calibración simple. Una vez que se dispone de este valor, puede calcularse el peso molecular del desconocido según:

$$M_1 = \left(\frac{k_2}{k_1} \quad [M_2]^{\alpha_2} \right)^{1/\alpha_1} \tag{8-15}$$

Donde M_1 es el peso molecular del desconocido, M_2 es el peso molecular obtenido de acuerdo a al calibración simple y α_1, k_1, α_2 y k_2 son constantes para el polímero en análisis y el estándar de referencia respectivamente. k y α se calculan:

$$k = 6.19 \; 10^9 \; K^{1/3} \tag{8-16}$$

$$\alpha = \frac{a + 1}{3} \tag{8-17}$$

donde K y a son las constantes de Mark-Houwink-Skurada para la fase móvil y la temperatura empleada, las cuales están tabuladas para la mayoría de los polímeros. En general, se ha encontrado que esta calibración es útil para la mayor parte de los polímeros, excepto para el caso de electrolitos o materiales excesivamente ramificados, siempre que se pueda precisar con exactitud los valores de las constantes de Mark-Houwink-Skurada, lo cual no siempre es posible en la práctica.

Otros métodos

Existen otras modalidades para calcular el peso molecular de un polímero, algunos muy simples como los que multiplican el peso molecular referido al poliestireno por un factor Q para el cálculo del peso molecular real, y otros muy complejos como los que involucran la calibración con estándares polidispersos. El método del factor Q es sencillo y resulta

bastante exacto para el análisis de poliolefinas utilizando poliestireno como estándar. Chaplin y colaboradores[39] compararon los pesos moleculares obtenidos utilizando estas dos últimas calibraciones y la calibración universal descrita anteriormente. Estos autores llegaron a la conclusión que la concordancia entre el peso molecular verdadero y el obtenido con el método del factor Q dependía en gran medida del peso molecular, siendo máxima cuando se comparaban polímeros de pesos moleculares iguales. Asimismo encontraron que la calibración con estándares polidispersos poco mejoraba los resultados obtenidos con el método del factor Q. El mejor método resultó ser el de la calibración universal en la mayoría de los casos ensayados. La descripción detallada de cada una de esas modalidades está fuera del alcance de este libro y para profundizarlas es posible recurrir a la literatura especializada[39,40]. Asimismo, es importante destacar que la utilización de un detector de dispersión de la luz láser de ángulo pequeño[41] (LALLS) evita los problemas de la calibración. Con este detector es posible calcular el peso molecular absoluto del polímero, si se dispone de otro detector adicional que sea sensible a la concentración de polímero (RI, UV).

Referencias

1. Flodin P.,Porath, J. Nature 183, 1657, (1959)
2. Moore J.C., J. Polim. Sci., Part A, 2, 835, (1964)
3. Bidlingmeyer B.A.,Warren F.V., LC-GC, 6,(9),(1988)
4. Screenivasan K., Nair P.D., Rathinam K., J. Liq. Chromatogr. 7, 2297, (1984)
5. Flodin P., Tesis, Universidad de Upsala, Upsala, Suecia (1962)
6. Atgelt K.H., P D Pet Chem. Am. Chem. Soc. 15 (2), A115, (1970)
7. Fukano K., Komita K., Sasaki H., Hashimoto T., J. Chromatogr. 166, 47, (1978)
8. Vivilecchia R.V., Lightbody B.G., Thimot N.Z., Quinn H.M., J. Chromatogr. Sci. 15, 424, (1977)
9. Majors R.E., J. Chromatogr. Sci. 18, 488,(1980)
10. Unger K., "Packing and Stationary Phases in Chromatographic Techniques", M. Dekker, N.Y. 1990
11. Giddings J.C., Anal Chem 39, 1027, (1967)
12. Yau W.W., Ginnard C.R., Kirkland J.J., J. Chromatogr. 149, 465, (1978)
13. Snyder L.R. y Kirkland J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2da. ed., J. Wiley, N.Y. 1979
14. Mori S., J. Chromatogr. 174, 23, (1979)
15. Mori S., J. Chromatogr. 156, 111, (1978)
16. Knox J.H., Me Lennan F., J. Chromatogr. 185, 289, (1979)
17. Hiatt C.W., Shelokov A., Rosenthal E.J., Galimore E., J. Chromatogr. 56, 362, (1971)
18. Engelhardt H., Mathes D., J. Chromatogr. 142, 311, (1977)
19. Chang S.H., Gooding K.M., Regnier F.E., J. Chromatogr. 125, 103, (1976)
20. Roumeliotis P., Unger R.K.K., J. Chromatogr. 185, 445, (1979)
21. Wehr C.T., Abbott S.R., J. Chromatogr. 185, 453, (1979)
22. Heyraud A., Rinaudo M., J. Chromatogr. 166, 149, (1978)
23. Barker P.E., Hatt B.W., Holding S.R., J. Chromatogr. 174, 143, (1979)
24. Hagel L., J. Chromatogr. 160, 59, (1978)
25. Granath K.A., Kuist B.E., J. Chromatogr. 28, 69, (1967)
26. Granath K.A., Kuist B.E., J. Chromatogr. 101, 137, (1974)
27. Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T., J. Chromatogr. 190, 297, (1980)
28. Alsop R.M., Vlachogiannis G.J.,J. Chromatogr. 246, 227, (1982)

29. Barker P.E., Hatt B.W., Holding S.R., J. Chromatogr. 206, 27, (1981)
30. Squire P., J. Chromatogr. 210, 433, (1981)
31. Shioka Y., Yoshida H., Nakajima T., J. Chromatogr. 240, 341, (1982)
32. Rokushika S., Ohkawa T.,Hatano H., J. Chromatogr. 176, 456, (1979)
33. Kato Y., Sasaki H., Aiura M., Hashimoto T., J. Chromatogr. 153, 546, (1978)
34. Okasaki M., Shiraishi K., Ohno Y., Hara I., J. Chromatogr. 223, 285, (1981)
35. Unger K.K. "Handbuch der HPLC", Teil 1. Leitfaden für Anfünger und Praktiber, Git Verlag GmbH 1989
36. Molko D., Derbyshire R., Guy A., Roget A., Teoule R., J. Chromatogr. 206, 493, (1981)
37. Ward T.C., J. Chem. Ed. 58, 867, (1981)
38. Grubisic Z., Rempp P., Benoit H., J. Polim. Sci., Part B 5, 753, (1967)
39. Chaplin R.P., Haken J.K., Paddon J.J., J. Chromatogr. 171, 55, (1979)
40. Yau W.W., Kirkland J.J., Bly D.D., "Modern Size Exclusion Liquid Chromatography", John Wiley and Sons, New York 1979
41. Ouano A.C., J. Chromatogr. 118, 303, (1976)
42. Barth H.G., Regnier F.E., J. Chromatogr. 192. 275, (1980)

Capítulo 9

Preparación de las muestras

9-1 Introducción

La preparación de las muestras es una etapa decisiva en todo método de análisis en especial en la determinación de microcomponentes (trazas) y en los casos donde la matriz que rodea al analito es muy compleja. La selección del método más apropiado depende de muchos factores como ser:

- **Propiedades físicas y químicas del analito**
  El conocimiento de algunas de las características fisicoquímicas del analito es esencial en el diseño de un método para la preparación de las muestras. Es conveniente conocer su estructura química, peso molecular, solubilidad, propiedades ácido base (pKa) y respuesta frente al tipo de detector seleccionado. Muchos analitos tienen respuestas bajas o directamente nulas frente a los detectores de uso más común como el detector UV y el de fluorescencia. En estos casos, especialmente si la concentración de analito es baja, encontraremos sin lugar a dudas un problema de detección, y consecuentemente, de cuantificación. Este problema puede resolverse derivatizando alguno de los grupos funcionales presentes en la molécula (sección 9.5).

- **Concentración de analito en la muestra**
  Este factor tiene importancia decisiva. Para analitos en altas concentraciones en general se requieren preparaciones de muestras sencillas como la solubilización y filtración. Analitos en bajas concentraciones, por su parte, pueden requerir metodologías más elaboradas que involucren numerosas operaciones para lograr una solución cuya concentración sea "aceptable" como para inyectarse en el cromatógrafo.

- **Naturaleza de la matriz de la muestra**
  La remoción de los componentes de la matriz puede ser un paso crítico en los casos donde la concentración de analito en la muestra se detecta con dificultad o no se detecta, cuando existen impurezas cuyos picos interfieren el pico de analito en la muestra, o cuando existen sustancias que pueden dañar irreversiblemente los instrumentos o las columnas cromatográficas.

- **Forma en la que se presenta el analito en la muestra**
  Es necesario conocer el estado en el que se encuentra el analito en la muestra para poder diseñar un método apropiado de preparación. En muestras de origen biológico el analito puede no encontrarse como tal sino unido a proteínas transportadoras (análisis de fármacos en suero o plasma), metabolizado como éster, amida o éter de los ácidos sulfúrico o glucurónico (análisis de diversas sustancias en orina) o metabolizado a otra sustancia diferente. En estos casos sus propiedades químicas pueden cambiar radicalmente. Es así que una sustancia totalmente no polar e insoluble en agua puede presentarse como un glucurónido polar y soluble en la orina, pero vuelve a comportarse como tal después de una hidrólisis con la enzima ß-glucuronidasa (esta enzima hidroliza la unión entre el analito y el ácido glucurónico).

- **Compatibilidad de los medios de solubilización y extracción con el sistema cromatográfico**

  En HPLC se requiere que la solución a inyectar sea compatible y miscible con la fase móvil. Es recomendable que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil o, en su defecto, un solvente débil (por ejemplo agua en fase reversa). Teniendo en cuenta este hecho es posible que se eviten numerosos problemas. Si se disuelve la muestra en un solvente fuerte, es posible que algunas sustancias precipiten al entrar en contacto con fases móviles acuosas. Al efectuarse inyecciones posteriores es posible que esas sustancias, por la presencia del solvente fuerte, migren dentro de la columna volviendo a precipitar y a redisolverse cíclicamente contaminando así el material de relleno de la columna en su totalidad. Además, la inyección de solventes más fuertes que la fase móvil puede producir deformaciones en los picos (sección 13.3).

  Muchos de los métodos que se utilizan para la preparación de las muestras involucran la extracción líquido-líquido del analito desde un medio acuoso hasta un medio orgánico ya sea por sus características no polares propias o adquiridas regulando el pH del medio. En estos casos la muestra final se encuentra disuelta en un solvente lipofílico (cloroformo, hexano, éter) por lo cual no resulta conveniente inyectarlo en un sistema convencional de fase reversa que contiene mezclas de solventes orgánicos y agua como fase móvil. En este caso se puede evaporar el solvente hasta sequedad y disolver el residuo en fase móvil (con el consecuente error que esta operación acarrea) o inyectar en fase normal la solución resultante. Aún teniendo especial cuidado, en este punto suelen presentarse problemas. Por ejemplo en el análisis de residuos de pesticidas se requiere, habitualmente, una extracción con solventes no polares seguida de una adsorción en Florisil o Alúmina, y una evaporación del solvente orgánico. Se ha reportado[1] que al disolver el residuo en una fase móvil acuosa es posible que se presenten problemas si el material de partida contiene aceites o grasas y, si se intenta disolver el residuo con solventes puros como metanol o acetonitrilo, es posible que se obtengan picos distorsionados debido a los efectos de solvente (sección 13.3).

- **Tipo de detector**

  La sensibilidad y selectividad del detector tienen un rol muy importante en el diseño de los métodos para la preparación de las muestras. Los detectores poco selectivos como el detector de índice de refracción generalmente requieren muestras mucho más "limpias" que los detectores más selectivos como el de fluorescencia. Por su parte, los detectores más sensibles (fluorescencia, amperometría) requieren menos pasos de preconcentración que aquellos menos sensibles (índice de refracción).

- **Compatibilidad con el detector**

  En la selección de un medio para la solubilización del analito debe considerarse su compatibilidad con el detector a utilizar. No es conveniente utilizar solventes como la acetona o el tolueno si se ha de emplear un detector UV porque estos solventes

poseen una elevada absorción de base, y pueden producir picos espurios o señales importantes en el frente del solvente. Igualmente no resulta muy prudente utilizar fases móviles de elevada conductividad si se desea emplear un detector conductimétrico.

En este capítulo hemos de tratar la preparación de las muestras desde un punto de vista práctico. Mencionaremos someramente las operaciones clásicas de la química analítica (sección 9.2), y nos dedicaremos en mayor profundidad a las preparaciones de muestras que se refieran exclusivamente a HPLC o que involucran pasos relativamente nuevos como la extracción en fase sólida (sección 9.3), el empleo de válvulas de intercambio de columnas (sección 9.4), la derivatización química pre y post-columna y los detectores de reacción (sección 9.5).

9.2 Metodologías convencionales

Tratamiento Previo

La naturaleza de la muestra dicta el modo básico de preparar la solución a inyectar. Si la muestra es líquida puede, como primera aproximación, inyectarse directamente previa filtración, en cambio si es un sólido es necesario molerlo y homogeneizarlo apropiadamente, y posteriormente las sustancias a analizar presentes en la matriz sólida deben solubilizarse en un solvente adecuado. Estos solventes deben seleccionarse por su poder solubilizante del analito y su bajo poder solubilizante de los componentes de la matriz de la muestra o de aquellas sustancias que puedan dañar las columnas o el equipo cromatográfico.

Tanto para el tratamiento previo de las muestras, como para posteriores pasos de purificación pueden utilizarse todas las operaciones conocidas de la química analítica como: liofilización, evaporación, filtración, centrifugación, precipitación, y solubilización. La **liofilización** y la **evaporación** son operaciones que se utilizan para remover el vehículo líquido en el cual se encuentra el analito con el fin de concentrarlo. La evaporación requiere que el analito sea estable térmicamente y que no se volatilice junto con el solvente, y generalmente se realiza después de secar la muestra apropiadamente con algún material desecante como el sulfato de sodio anhidro. Analitos termolábiles deben liofilizarse mientras que analitos oxidables pueden evaporarse con la ayuda de una corriente de nitrógeno. La **filtración** y la **centrifugación** son operaciones que se utilizan para la separación de líquidos y sólidos. La **precipitación** se utiliza habitualmente para separar del analito sustancias que pueden interferir, contaminar las columnas o el equipo cromatográfico.

Desproteinización

Las proteínas presentes en las matrices biológicas deben eliminarse antes de inyectar la muestra en el equipo de HPLC para evitar que precipiten dentro del equipo cromatográfico. Esta operación se denomina desproteinización. De todos modos resulta conveniente eliminarlas de todas las muestras aunque no se inyecten directamente debido a que pueden resultar una molestia para los métodos de preparación utilizados. Por ejemplo, en el caso de la extracción líquido-líquido suelen actuar como formadoras de emulsiones muy difíciles de romper.

La desproteinización es una forma particular de la separación de sustancias por precipitación. Se realiza con el agregado de varios agentes[2], entre ellos: solventes orgánicos, sales, ácidos o cationes, o bien por ultrafiltración. Los solventes orgánicos como el metanol, acetonitrilo o etanol agregados a una solución acuosa de una proteína disminuyen su solubilidad y, en condiciones adecuadas, inducen a su precipitación. Cuanto menor sea la polaridad del solvente agregado mejor será su capacidad de desproteinización. El agregado de sales neutras, **salting in**, disminuye la atracción de las moléculas de las proteínas y aumenta su solubilidad. Si se continua aumentando la concentración de sales éstas comienzan a competir con las moléculas de las proteínas por el agua, logrando como resultado la precipitación de la proteína por deshidratación. Este fenómeno se conoce con el nombre de **salting out**. Ciertos ácidos (túngstico, tricloroacético TCA, perclórico, metafosfórico, y una mezcla de ácidos túngstico y metafosfórico) forman sales insolubles con las proteínas cargadas positivamente. Se agregan a la muestra en solución al 10-20 %, se centrifuga y el sobrenadante se puede inyectar en el HPLC, aunque, debido a su elevada acidez, resulta conveniente neutralizar la solución resultante previo a la inyección. Finalmente, ciertos cationes (Hg^{2+}, Cd^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+} y Zn^{2+} o mezclas de ellos

AGENTE	PROPORCION
Acetonitrilo	1.5 vol
Metanol	2.0 vol
Acetona	1.5 vol
TCA al 10 % P/V	0.2 vol
$HClO_4$ al 6 % P/V	0.8 vol
Soluc $ZnSO_4$/NaOH	2.0 vol

Tabla 9.I Concentraciones mínimas de desproteinizante necesario para precipitar el 99 % de las proteínas presentes en un volumen de suero, de referencia 3.

con Ba^{2+}) inducen la precipitación por desnaturalización y la solución resultante luego de centrifugar puede inyectarse directamente.
Blanchard[3] ha realizado una excelente evaluación de la capacidad para eliminar las proteínas de los agentes desproteinizantes más comunes midiendo el contenido de proteínas remanentes en solución después de aplicar la solución de desproteinizante. Las cantidades mínimas de desproteinizante para precipitar el 99 % de las proteínas de un pool de plasma humano que contenía 89.3 g/100 ml de éstas en solución se detallan en la tabla 9.I.
En muchos casos durante la desproteinización se produce una pérdida de analito por adsorción al precipitado lo que acarrea bajas recuperaciones, es decir baja exactitud analítica (sección 12.5). Este efecto puede minimizarse controlando apropiadamente las condiciones en las que se realiza la desproteinización y agregando la solución muestra al agente desproteinizante y no el agente desproteinizante a la solución muestra. Es importante destacar que la utilización de métodos de preparación de la muestra más modernos como la extracción en fase sólida (sección 9.3) o la cromatografía con intercambio de columnas (sección 9.4) evita, en muchos casos, la necesidad de desproteinizar.

Extracción líquido-sólido

La extracción líquido-sólido, también denominada **lixiviación**, comprende la solubilización del analito presente en una muestra sólida previamente molida con un solvente adecuado, con la ayuda de agitación. La muestra puede agitarse manualmente o con agitadores mecánicos o ultrasónicos. Las características del solvente de solubilización, la cantidad de extracciones, la velocidad y el tiempo de agitación dependerán tanto de las características del analito como de la matriz que lo rodea. Un tipo especial de extracción líquido-sólido emplea sistemas continuos con solventes calientes (Soxhlet) y se aplican a analitos poco solubles o a matrices muy complejas.
Una modalidad análoga a la extracción líquido-sólido es la **extracción con fluidos supercríticos, SFE**. Esta metodología, introducida por varios autores en la década del '70, comenzó a utilizarse como una herramienta analítica para la extracción de sustancias orgánicas en matrices sólidas recién en 1980. Se fundamenta en que los fluidos comprimidos en las proximidades de sus valores críticos poseen efectos extractivos similares a los observados en los líquidos. Los fluidos supercríticos tienen densidades y propiedades de solvatación muy semejantes a los líquidos, pero poseen viscosidades menores y difusividades mayores. Adicionalmente, tienen baja toxicidad e inflamabilidad. En la tabla 9.II se resumen las condiciones críticas y la densidad en el punto crítico de algunos fluidos supercríticos.
De todos los fluidos mencionados el dióxido de carbono es el más utilizado, ya sea sólo o mezclado con modificadores más polares, debido a que es barato y a que su temperatura crítica es baja. Esta última propiedad lo hace especialmente útil para extraer analitos volátiles.

La extracción con fluidos supercríticos ha sido utilizada exitosamente para la extracción de diversas sustancias orgánicas en matrices sólidas[4-7] y recientemente se ha demostrado[8] que, en muchos casos, las extracciones con fluidos supercríticos son más rápidas y sencillas que los métodos convencionales de sonicación o extracción con Sohxlet. A pesar de ello, existen relativamente pocos métodos de aplicación detallados en la literatura y algunos autores[9] consideran que la inversión en equipos de SFE no parece justificarse hasta el momento.

Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es la distribución (partición) de un analito entre dos líquidos inmiscibles y está representada por el equilibrio:

$$[A]_o \rightleftharpoons [A]_{aq}$$

donde $[A]_o$ es la concentración de analito en la fase orgánica, y $[A]_{aq}$ es la concentración de analito en la fase acuosa. La distribución (coeficiente de partición) está dado por la relación de concentraciones de analito en las dos fases, es decir:

$$\mathbf{k} = \frac{[A]_o}{[A]_{aq}} \qquad \mathbf{(9\text{-}1)}$$

donde K es el coeficiente de partición de actividades de A. Para este cálculo se asume que variaciones en la concentración de analito no modifican apreciablemente la miscibilidad mutua entre los dos solventes utilizados. K depende de tipo de solvente orgánico a utilizar, de la temperatura y, para solutos ionizables, del valor del pH del medio acuoso. Como el

FLUIDO	**PRESION CRITICA atm**	**TEMPERATURA CRITICA °C**	**DENSIDAD en el P.C. g/ml**
Dióxido de carbono	72.9	31.3	0.448
n-Pentano	33.3	196.6	0.232
Hexafluoruro de Azufre	37.1	45.6	0.752
Isopropanol	47.0	253.3	0.273

Tabla 9.II Propiedades de algunos fluidos supercríticos

valor de K es finito, en muchos casos el proceso de partición debe favorecerse ya sea utilizando grandes volúmenes de extractante o realizando varias extracciones de una misma muestra.

Las sustancias neutras de características no polares pueden extraerse desde sistemas acuosos a orgánicos directamente. Las sustancias con características ionizables requieren la supresión de su disociación modificando el valor del pH del medio. Es así que los analitos ácidos se extraen después de una acidificación de la muestra con ácido clorhídrico y los básicos de una alcalinización con hidróxido de sodio.

Los compuestos iónicos e ionizables se pueden extraer de los sistemas acuosos como **iones apareados neutros**, si se tratan con los correspondientes reactivos de apareamiento iónico. En este caso los analitos ácidos se aparean en medio neutro o ligeramente alcalino con apareantes básicos, es decir:

$$\mathbf{R - COOH \rightleftharpoons R - COO^- + H^+}$$

$$\mathbf{R - COO^- + X^+ \rightleftharpoons R - COO^- X^+}$$

donde X^+ representa al contraión (una sal de amonio cuaternario) y $R\text{-}COO^-X^+$ al par iónico. La extracción de pares iónicos ha sido exitosamente empleada en la determinación de Tetraciclinas en plasma[10] utilizando una sal de tetrabutilamonio como reactivo apareante.

Igualmente, en medio ácido los analitos básicos se aparean con reactivos de apareamiento ácidos, es decir:

$$\mathbf{R - NH_2 + H^+ \rightleftharpoons R - NH_3^+}$$

$$\mathbf{R - NH_3^+ + X^- \rightleftharpoons R - NH_3^+ X^-}$$

donde X^- representa al contraión (un ácido sulfónico) y $R\text{-}NH_3^+X^-$ al par iónico.

La operación denominada **salting out** es un modo especial de extracción líquido-líquido en la cual se agregan altas concentraciones de sales al medio acuoso con el objeto incrementar la fuerza iónica (y la polaridad) de la fase acuosa. De esta manera se disminuye la afinidad de solutos medianamente polares por el medio acuoso y se los hace extraíbles en un medio orgánico.

La extracción convencional líquido-líquido es una operación lenta y tediosa, muy dependiente de la habilidad del operador y que está expuesta a numerosos problemas (formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de solventes tóxicos e inflamables, peligro en evaporaciones finales, etc). Adicionalmente, en el análisis de trazas debe considerarse que los solventes de extracción pueden agregar nuevos compuestos a la muestra a analizar (sus propias impurezas) y que estos compuestos pueden interferir en la determinación del analito.

Filtración

Tanto las muestras como los estándares a inyectar deben estar totalmente libres de partículas en suspensión. Las partículas presentes en las muestras pueden rayar los sellos del inyector, o bloquear algún componente del equipo cromatográfico especialmente tuberías o filtros de columnas o guardacolumnas. La filtración de las muestras se realiza en filtros desmontables o fijos que contienen membranas de 0.45 ó 0.22 µm de un material apropiado. Estos filtros se seleccionan de acuerdo a su resistencia frente al solvente de disolución de las muestras como ya hemos descrito anteriormente para los solventes (ver tabla 4.IV).

Se debe tener especialmente en cuenta la posible adsorción de analito a las membranas. Para ello se suele filtrar una solución estándar de analito y se inyecta en el equipo de HPLC tanto la muestra filtrada como la muestra sin filtrar y se compara la concentración hallada de analito en ambas. Además puede ser conveniente evaluar si la membrana introduce picos adicionales de sus componentes a la solución a inyectar. Para ello se filtra un poco del solvente que se utiliza como medio de disolución para el analito y se lo inyecta. Si aparecen picos no adjudicables al solvente puro es conveniente lavar la membrana con la misma solución a filtrar descartando los primeros mililitros. En los casos donde el analito se adsorbe a las membranas, o cuando la cantidad de muestra disponible es muy pequeña como para intentar una filtración, la remoción de las partículas puede lograrse centrifugando la solución.

9.3 Extracción en Fase Sólida

La extracción en fase sólida (SPE) es una modalidad de preparación de las muestras que ha tenido amplia difusión desde fines de la década del '70 y principios del '80. Consiste en una extracción líquido-sólido a través de una columna o cartucho. Más recientemente, se han desarrollado sistemas de extracción[11] en los que la preparación de las muestras se realiza sobre discos que contienen el material de separación impregnado en PTFE o PVC. El vasto desarrollo que esta metodología ha experimentado en los últimos años, permite actualmente operar con columnas conteniendo los materiales de relleno más variados, con lo cual es posible resolver un gran número de aplicaciones.

Columnas de extracción

La extracción en fase sólida se lleva a cabo en pequeñas columnas o cartuchos de plástico (usualmente polipropileno) como la ilustrada en la figura 9.1. Estas columnas se rellenan con cantidades variables (desde 100 hasta 500 mg) de distintos materiales similares a los

empleados para el relleno de las columnas de HPLC, de mayor granulometría (típicamente de 40 μm) y con una pequeña distribución de tamaños de partícula. Los materiales que se emplean para el relleno comprenden desde adsorbentes muy polares como la sílica, hasta muy poco polares como la sílica unida a los grupos C18, pasando también por materiales de intercambio iónico, pudiendo tratarse de fases enlazadas a la sílice o a polímeros como estireno-divinilbenceno. Existen, asimismo, otros materiales de relleno menos difundidos como las resinas Amberlite XAD-2, XAD-4, y XAD-7, el DVB y el Porapaq Q cuyo uso ha sido recopilado en la literatura[12]. Los materiales de relleno más comunes se detallan en la tabla 9.III y los sistemas para la preparación de las muestras en la tabla 9.IV.

TIPO DE RELLENO		CARACTERISTICAS
Diamino *	$-(CH_2)_3NHCH_2CH_2NH_2$	Intercambiador aniónico débil
Amonio cuaternario *	$-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3Cl^-$	Intercambiador aniónico fuerte
Acido carboxílico *	$-(CH_2)_3COOH$	Intercambiador catiónico débil
Acido sulfónico *	$-C_6H_4-SO_2OH$	Intercambiador catiónico fuerte
Alúmina		Sorbente polar
Florisil	Silicato de Magnesio activado	Sorbente polar
Silicagel		Sorbente polar
Tierra de diatomea		Sorbente polar
Ciano *	$-(CH_2)_3CN$	Sorbente de polaridad media
Amino *	$-(CH_2)_3NH_2$	Sorbente de polaridad media
Fenilo *	$-C_6H_5$	Sorbente no polar
Octilo *	$-C_8H_{17}$	Sorbente no polar

Tabla 9.III Materiales de relleno de los cartuchos de extracción en fase sólida, los indicados con * representan fases ligadas

En general, la capacidad de retención de solutos de una columna de SPE depende del tipo de material de relleno, del tamaño de la columna, del tipo de analito y las condiciones de extracción. El conocimiento exacto de esta capacidad no resulta de vital importancia si se asume que estas columnas se utilizan para concentrar compuestos al nivel de trazas. Wainer[13] ha estudiado la capacidad de columnas conteniendo 200 mg de material de relleno, de polaridades diferentes encontrando capacidades cuyos valores oscilaban entre 3 y 12 mg de analito. El mismo autor indica que, si se encuentran presentes otros componentes en la matriz de la muestra la capacidad de la columna se reduce proporcionalmente a la cantidad de compuestos retenidos.

El Proceso de la Extracción

La extracción en fase sólida tiene lugar mediante mecanismos de sorción-desorción de los

MATERIAL DE RELLENO	TIPOS DE ANALITOS	NATURALEZA DE LA MATRIZ	ACTIVACION DE LA COLUMNA	SOLVENTE DE ELUCION
C18/C8	Sustancias no polares Sustancias ionizables, en su forma no ionizada	Acuosa	Metanol Agua	MeOH/AcN o mezclas de éstos con agua o buffers de pH adecuado
Sílice Diol CN	Sustancias polares	Solución en solventes no polares Aceites	Cloroformo Hexano	Solventes polares IPA, MeOH
Aniónico	Aniones Carboxilatos/Sulfonatos	Soluciones acuosas de baja fuerza iónica	Metanol Buffer	Buffers de alta fuerza iónica y pH adecuado. Sólo o en mezclas con MeOH o AcN
Catiónico	Cationes Aminas	Soluciones acuosas de baja I	Metanol Buffer	Buffers de alta de pH adecuado sólo o en mezclas con MeOH o AcN

Tabla 9.IV Sorbentes más comunes y sistemas de preparación

analitos en la superficie del material activo de las columnas. La retención y elución obedece o bien a una partición o bien a los mismos principios tratados anteriormente para fase reversa (capítulo 5), fase normal (capítulo 6) e intercambio iónico (capítulo 7). La SPE puede considerarse como una extracción líquido-sólido aunque algunos de los mecanismos que involucran la retención obedezcan a fenómenos diferentes. Existe un equilibrio entre la concentración de analito en la fase estacionaria $[A]_{fe}$ y la fase móvil $[A]f_m$, es decir:

$$[A]_{fe} \rightleftarrows [A]_{fm}$$

para que el analito presente en la muestra se retenga en la columna este equilibrio debe estar desplazado hacia la izquierda. mientras que para conseguir la elución del analito en cuestión el equilibrio debe desplazarse hacia la derecha. Los mecanismos para desplazar estos equilibrios se describirán más adelante.

En los materiales de relleno conteniendo tierras de diatomea se produce una partición entre el agua presente en el vehículo de la muestra que queda adsorbida en la superficie del relleno, y el solvente orgánico que se selecciona para la elución del analito, es decir

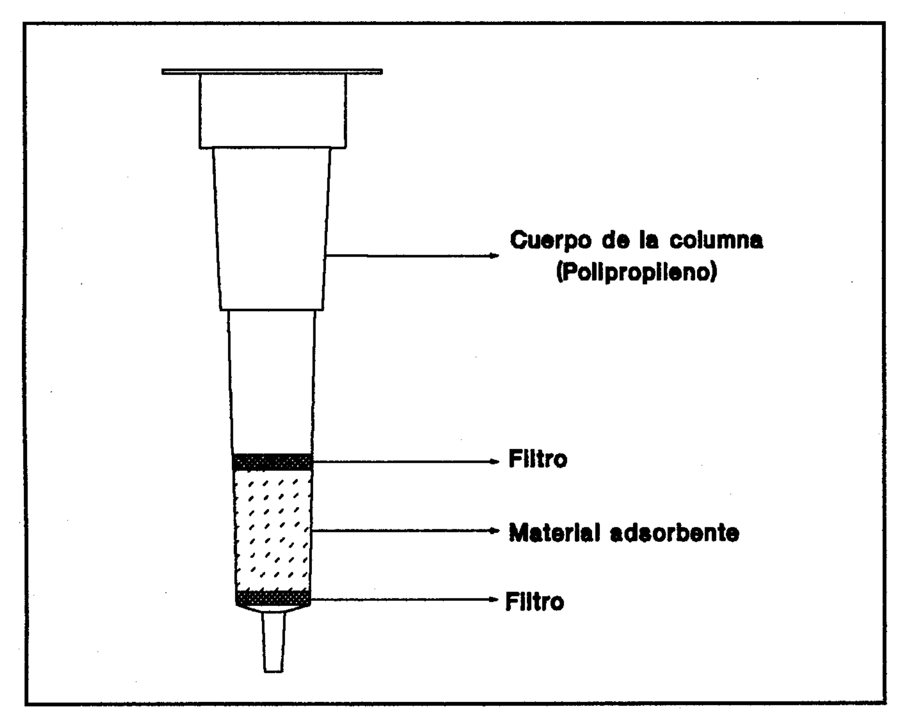


Fig. 9.1 Esquema de una columna de extracción en fase sólida.

una partición líquido-líquido. Por ejemplo, en la separación de los distintos ginsenósidos en extractos de Panax Ginseng la preparación de la muestra implica una partición entre el agua adsorbida sobre Diatomea y butanol saturado en agua[14].

En la tabla 9.IV se resumen las características los sistemas de preparación de las muestras en las columnas de extracción más comunes. Las sustancias neutras no polares, se retienen de vehículos polares en columnas no polares del tipo C8 o C18, estas columnas se lavan con mezclas de agua:solvente orgánico y los analitos se eluyen con algún solvente orgánico (metanol, acetonitrilo) ya sea puro o en mezclas con agua.

La retención de las sustancias ionizables está regulada por el valor del pH del medio en el que se encuentran, pudiendo comportarse como sustancias no polares (formas no disociadas) o polares (formas disociadas). Las sustancias ionizables de carácter ácido pueden retenerse en columnas intercambiadoras de aniones si se encuentran en su forma

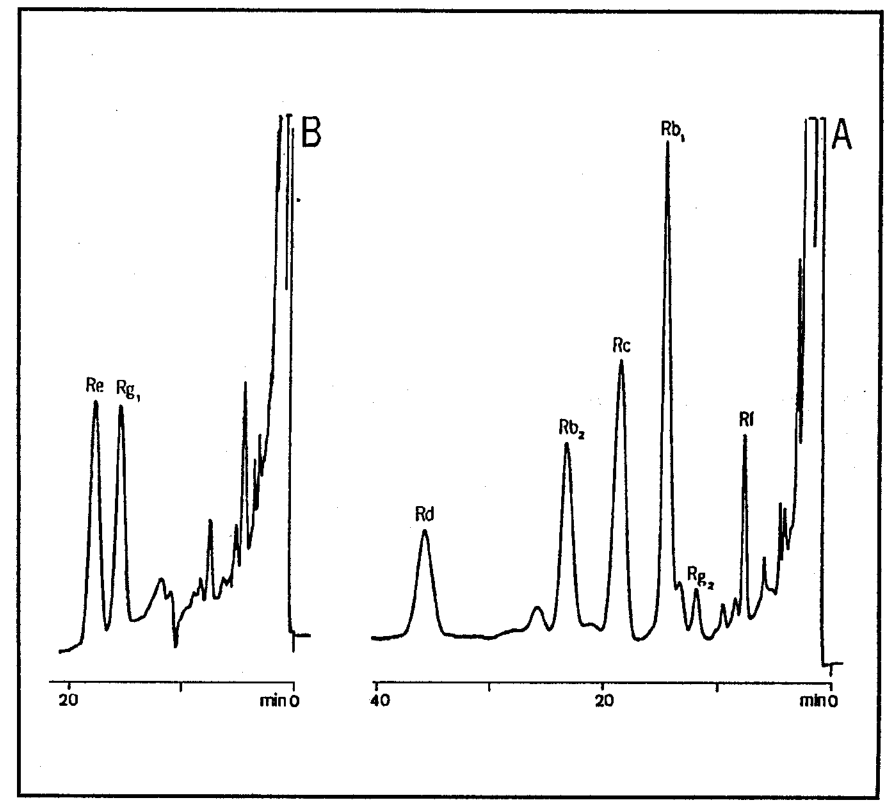


Fig. 9.2 HPLC de Ginsenósidos. Columna: RP18, Fase Móvil: A) AcN:Agua (29:17), Caudal: 2 ml/min; B) AcN:Agua (18:82), Caudal: 4 ml/min. De referencia 14 con permiso del editor.

cargada, es decir si el pH del medio es dos unidades mayor que el valor del pKa del ácido. La elución se consigue bajando el valor del pH del medio por debajo del pKa, incrementando la fuerza iónica, utilizando un solvente orgánico o combinando las tres condiciones. Asimismo, estas sustancias pueden retenerse en columnas no polares si el valor del pH del medio es dos unidades menor que el valor del pKa del ácido en cuestión. En este caso la elución se consigue o bien aumentando el valor del pH o bien agregando solventes orgánicos (metanol o acetonitrilo) o mezclas de solventes orgánicos con agua.
Del mismo modo, las sustancias ionizables de carácter básico pueden retenerse en columnas intercambiadoras de cationes si se encuentran en su forma cargada, es decir si el pH del medio es dos unidades menor que el valor del pKa de la base. La elución se consigue incrementando el valor del pH del medio por encima del pKa, incrementando la fuerza iónica, utilizando un solvente orgánico o combinando al mismo tiempo las tres condiciones. Asimismo estas sustancias pueden retenerse en columnas no polares si el valor del pH del medio es dos unidades superior que el valor del pKa de la base en cuestión. En este caso la elución se consigue o bien disminuyendo el valor del pH o bien agregando solventes orgánicos (metanol o acetonitrilo) o mezclas de solventes orgánicos con agua.

Las sustancias iónicas son difíciles de retener en materiales de fase reversa pero se retienen sin dificultades en materiales de intercambio iónico. En este caso la elución se consigue modificando la fuerza iónica y el contenido de solvente orgánico del medio.

Si se utilizan columnas de fase ligada, es posible eliminar la interferencia de los silanoles libres presentes en el material de relleno de las columnas disminuyendo el valor del pH del medio o por el agregado aminas (TEA, DEA, EA, etc) como se indica en la sección 11.1. Esta operación hace más reproducible la extracción.

Metodología para la extracción

La selección de las condiciones óptimas para la extracción dependen de la naturaleza del analito y de la matriz que lo rodea (ver tabla 9.IV). Para la preparación de las muestras se utilizan los pasos que se describen a continuación:

- **Lavado y activación de la columna**, Esta operación tiene por objeto solvatar los grupos funcionales del material de relleno de la columna. Los analitos no pueden interactuar con el relleno de la columna si sus grupos no se encuentran totalmente "activados", especialmente en el caso de las cadenas del material de relleno de fase reversa que deben "estirarse" para lograr la interacción.

  En fase reversa la activación se suele realizar percolando aproximadamente dos volúmenes de columna de un solvente orgánico y luego dos volúmenes de columna de agua o buffers acuosos (el volumen de una columna de 200 mg de material de relleno es aproximadamente 250 µl). El primer paso, se utiliza además para eliminar las sustancias provenientes de muestras anteriores que quedaron retenidas en la

columna, y se realiza fluyendo metanol u otros solventes menos polares como AcN ó THF. El segundo paso, se utiliza para equilibrar la columna con un solvente igual o similar al empleado como medio de disolución de las muestras.

- **Aplicación de la muestra**, la muestra se aplica en la columna utilizando un caudal determinado (típicamente 1 a 10 ml/min), este paso debe efectuarse lentamente porque caudales demasiado rápidos a través de la columna pueden producir efectos cinéticos en el material de relleno que conducen a bajas recuperaciones de analito. Esta operación puede efectuarse de dos maneras diferentes de acuerdo al modo de trabajo que se seleccione, estas dos modalidades son:

  1 - Aplicación directa de la solución a inyectar de manera tal de lograr la elución del analito y la retención de impurezas cuyo comportamiento sea muy afín a la columna. En este caso la preparación de la muestra finaliza con esta operación.

  2 - Retención del analito en la columna utilizando un solvente débil, en general seguido de un lavado con un solvente con el cual no eluya el analito y posterior elución con un solvente fuerte. Este método es el más habitual y puede utilizarse para la preconcentración de muestras pasando grandes volúmenes a través de la columna. Por ejemplo, la metodología planteada por la EPA para la determinación de sustancias semivolátiles en agua[15] comprende el pasaje por el cartucho de 1000 ml de muestra.
  En este caso la preparación de la muestra debe continuarse como se describe en "Lavado de la columna".

  Si la muestra contiene una alta proporción de sólidos suspendidos, los filtros de la columna pueden taparse, por lo cual se recomienda filtrar las muestras turbias o con materia en suspensión.

- **Lavado de la columna**, esta operación se refiere a la eliminación de las impurezas retenidas en el paso anterior utilizando un solvente relativamente débil con el cual el analito no eluye. El lavado de la columna no es indispensable, pero en general es recomendable porque produce muestras más "limpias", con menos sustancias que interfieren.

- **Elución del analito**, finalmente el analito se eluye con un solvente tal que posea la fuerza de elución apropiada utilizando para ello desde 5 hasta 20 volúmenes de columna.

Dependiendo del diseño de las columnas y de las necesidades del usuario, el solvente a pasar puede impulsarse con la ayuda de una jeringa o aspirarse con vacío. Es importante aclarar que durante la operación de aplicación de la muestra y en los sucesivos pasajes de solvente, lavado y elución, las columnas deben mantenerse húmedas y **no dejar que se sequen** para obtener una buena recuperación de analito. Si la cantidad de muestras a procesar es muy grande la preparación puede resultar larga y tediosa. Por ello se han diseñado dispositivos que pueden efectuar automáticamente todas las operaciones

citadas. En estos dispositivos se colocan varias columnas juntas de manera tal que es posible procesar varias muestras en forma simultánea. En muchos casos las columnas pueden reutilizarse dependiendo de la naturaleza de los componentes de la matriz y de las condiciones de lavado.

Aplicaciones

En la tabla 9.V se resumen algunas de las numerosas aplicaciones reportadas en la literatura sobre la utilización de la extracción en fase sólida para la preparación de las muestras.

9.4 Intercambio de Columnas

La cromatografía de intercambio de columnas, **Column Switching Chromatography**, tiene su origen en la cromatografía gaseosa, donde su aplicación no tuvo demasiada difusión. En HPLC fue introducida por Huber y col[47] en 1973. Este autor dividió el eluyente de una columna simple de manera tal que su salida pudiera intercambiarse hacia cualquiera de dos columnas secundarias que poseían diferentes áreas superficiales, operando en un modo simple. De esta manera los compuestos muy retenidos se intercambiaban hacia la columna de menor capacidad de retención y podían eluirse inicialmente. Este diseño fue mejorado posteriormente por el mismo autor[48] al reportar un intercambio de columnas incluyendo una columna en serie al grupo de operaciones conocidas. El principal problema que se debía enfrentar en aquellos primeros trabajos era la falta de válvulas apropiadas con bajos volúmenes muertos y capacidad para operar a altas presiones.

Actualmente pueden obtenerse comercialmente válvulas capaces de operar a altas presiones, con varias posiciones y varios puertos, que producen bajos ensanchamientos de la banda cromatográfica[49] por lo cual la utilización del sistema de intercambio de columnas se está incrementando día a día. Estas válvulas están construídas de acero inoxidable, soportan presiones de hasta 6000 psi, y se accionan mediante actuadores electrónicos o neumáticos. Estos actuadores pueden conectarse fácilmente a integradores, controladores del equipo cromatográfico o a computadoras de laboratorio para automatizar la operación de intercambio. Así, Willmont y col[50] utilizaron válvulas controladas por una computadora para la separación de dibenzodioxinas de compuestos similares como PCBs y pesticidas organoclorados.

Además, existen válvulas denominadas de intercambio de solventes que operan a bajas presiones por lo que pueden utilizarse en las zonas del cromatógrafo donde las presiones

SUSTANCIA ANALIZADA	MATRIZ	COLUMNA	MET ANAL	REF
Metoclopramida	Suero	Diatomea	HPLC	16
Clonidina	Plasma	Diatomea	GC	17
Aflatoxina	Leche	Diatomea	TLC	18
Benzodiazepinas	Sangre/Orina	Diatomea	HPLC	19
Conservadores/Sacarina	Alimentos	Diatomea	HPLC	20
Patulina	Jugos de fruta	Diatomea	HPLC	21
Nitrosaminas	Cosméticos	sílica	GC	22
Compuestos Fenólicos	Petróleo y deriv.	Sílica	HPLC	23
Bencidina/diclorbencidina	Agua	C18	HPLC	24
Carbarilo/1-Naftol	Agua	C18	HPLC	25
Aldicarb y carbofuran	Agua	Sílica	HPLC	26
Bifenilos polibrominados	Grasas animales	Florisil/C18	GC-EC	27
Hidrocarburos policíclicos	Aire	Sílica	HPLC	28
Histaminas	Vino, Mostos	C18	HPLC	29
Aflatoxina M_1	Leche	C18	HPLC	30
Vitaminas Liposolubles	Fármacos	C18	HPLC	31
Zearalenona	Maíz	Sílica	HPLC	32
Paraquat	Girasol	C18	HPLC	33
Aflatoxinas	Maíz	Sílica	HPLC	34
Vitamina B_6 y análogos	Leche	C18	HPLC	35
Ac. ascórbico, dehidroas-córbico y dicetoglucónico	Jugos de frutas y vegetales	C18	HPLC	36
Dinitrofenilhidrazonas de ác. -cetodicarboxílicos	Cítricos	C18	HPLC	37
Teobromina, Teofilina y Cafeina	Alimentos	C18	HPLC	38
Sacarina y Conservadores	Alimentos	C18	HPLC	39
Ginsenósidos	Extracto de Panax Ginseng	C18	HPLC	40
Gentamicina	Plasma, orina	C18	HPLC	41
Metotrexato	Fluidos biológicos	C18	HPLC	42
Ac Biliares	Plasma	C18 Sílica	GC HPLC	43
p-Toluensulfonamida	Sacarina	C18	HPLC	44
Cefalosporinas	Suero	C18	HPLC	45
Propanolol	Fluido de diálisis	C18	HPLC	46

Tabla 9.V Extracción en fase sólida. Ejemplos de aplicación

son bajas, es decir entre el reservorio de solventes y la bomba, y después de la salida de la columna. Se usan en combinación con las válvulas de alta presión para las metodologías de intercambio de columnas donde se seleccionan distintos solventes, y también se utilizan solas para lavar las columnas, recolectar fracciones o purgar las celdas de referencia de los detectores[51]. Estas válvulas son menos costosas que las válvulas de alta presión pues están construídas de teflón en lugar de acero inoxidable y operan a presiones de hasta unas 100 psi (7atm).

La cromatografía de intercambio de columnas ha demostrado poseer una gran versatilidad para resolver numerosos problemas analíticos y adaptarse a la automatización de los equipos cromatográficos.

Modos de operación

La cromatografía de intercambio de columnas comprende varios modos diferentes de operación, entre ellos la selección de columnas, la operación en contracorriente, la preparación de la muestra en la misma línea del cromatógrafo en forma automática (clean up on-line), varias metodologías de corte, preconcentración (enriquecimiento) y la cromatografía multidimensional. Todas estas modalidades se describirán a continuación.

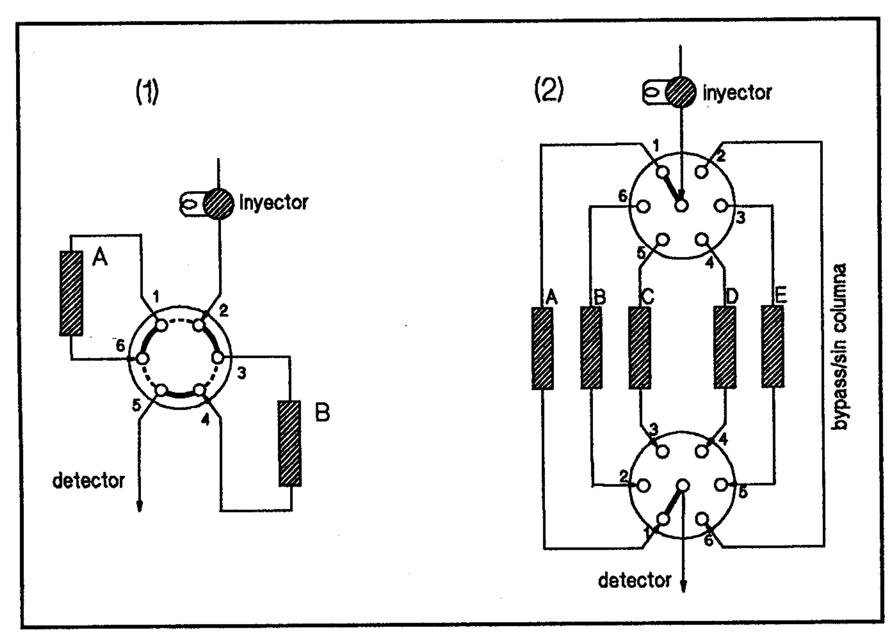


Fig.9.3 Cromatografía de intercambio de columnas: Selección de columnas. Gentileza de Rheodyne Inc.

Selección de columnas

Los instrumentos de cromatografía gaseosa están diseñados para operar con más de una columna a la vez, mientras que en los equipos de HPLC cada vez que se desea realizar un cambio de método analítico se requiere de un cambio de las columnas con sus correspondientes uniones. La cromatografía de intercambio (switching) operando en el modo de selección de columnas intenta simplificar esta operación.

Esta modalidad involucra la selección de las columnas para operar secuencialmente con sistemas cromatográficos diferentes. Las características y la cantidad de las válvulas a emplear dependen de la cantidad de columnas a seleccionar. En la figura 9.3 se ejemplifican dos casos diferentes. En (1) se esquematiza una selección de dos columnas A y B utilizando una válvula de 6 vías y dos posiciones. El intercambio del circuito B al A se realiza después de llevar el caudal a cero. En (2) se esquematiza la selección de cinco columnas utilizando dos válvulas de seis posiciones. Harvey y Stearns[49] han reportado un sistema que permite regenerar una columna mientras se efectúan los análisis de rutina en otra diferente. Este sistema está compuesto por dos válvulas de diez vías y una de seis. Esquivel y Rothman[52] reportaron la utilización de dos válvulas de seis vías para el intercambio de hasta cinco columnas en forma automática operando en sistemas de fase normal y reversa, el sistema está diseñado de tal modo que se lava con un solvente

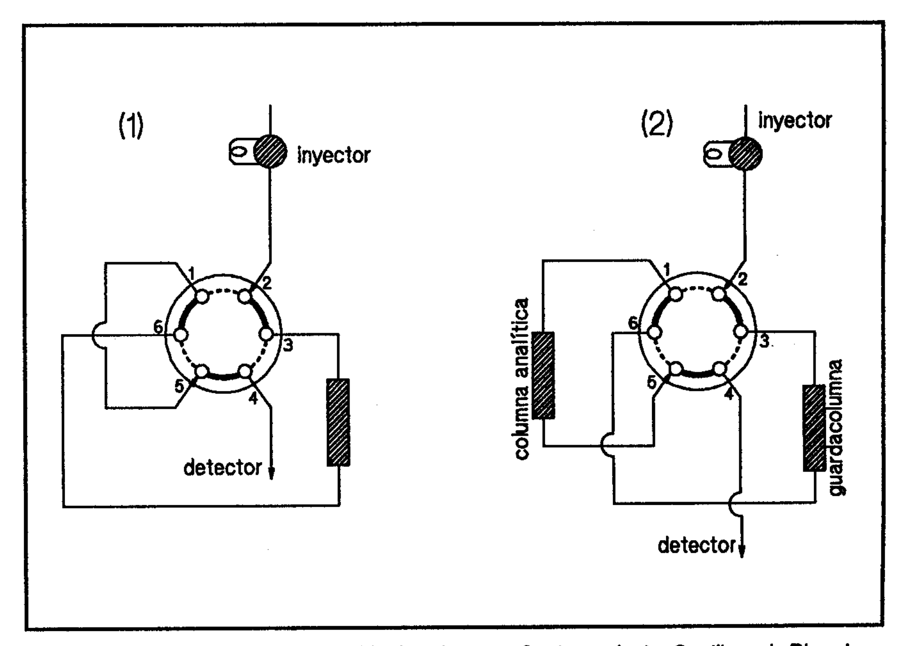


Fig. 9.4 Cromatografía de intercambio de columnas: Contracorriente. Gentileza de Rheodyne Inc.

adecuado antes de comenzar a utilizar una columna dada.

La selección de columnas, combinada con algún dispositivo que permita el cambio automático de solventes como las válvulas de intercambio de baja presión, permite cambiar automáticamente las columnas y los solventes. Este sistema unido a su vez a un inyector automático permite utilizar el cromatógrafo sin la ayuda de operador, por largos intervalos de tiempo aprovechando al máximo la capacidad de muestras de estos inyectores, ya sea operando con diferentes metodologías (diferentes columnas y diferentes solventes) o buscando las mejores condiciones para realizar una separación durante la noche.

Contracorriente

Con frecuencia, algunos compuestos muy afines al material de relleno de las columnas se retienen fuertemente, no eluyen en las condiciones de operación y deben removerse

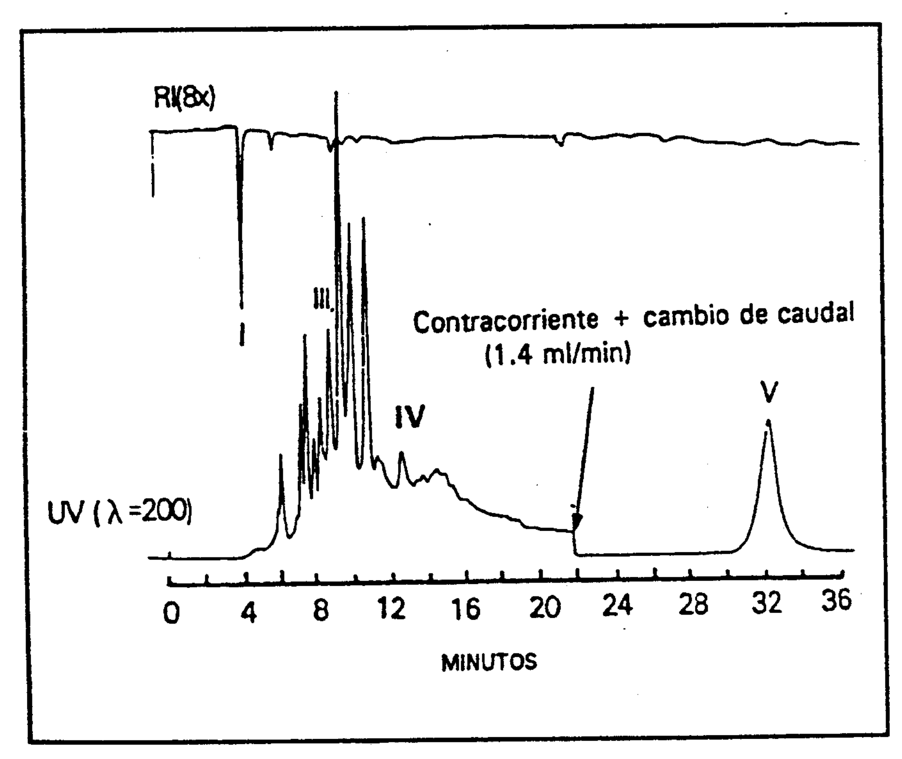


Fig. 9.5 Separación de hidrocarburos con técnicas de intercambio de columna y contracorriente. Columna: MicroPack CN-5 y Sílica en serie. Fase Móvil: n-hexano seco, Caudal: 0.7 ml/min cambiando a 1.4 ml/min después de invertir el caudal. Superior RI 8x, Inferior UV 200 nm. I = saturados, III = aromáticos, IV = PAH'S, V = polares. Reproducido de referencia 54 con permiso del editor.

diariamente con el lavado. Esta situación no presenta ningún problema siempre y cuando las sustancias muy retenidas no sean las de interés cuantitativo. Si lo son, debe optarse por dos métodos cromatográficos diferentes, utilizar un gradiente que aumentando la fuerza del solvente permita la elución de estas sustancias muy retenidas o intentar una cromatografía de intercambio de columnas en la que se incluya un cambio hacia el modo contracorriente. Si se emplea un detector de índice de refracción la única alternativa es el uso de un sistema en contracorriente. En este caso particular, no es posible trabajar con gradientes debido a que, al cambiar la composición de la fase móvil, se modifica el índice de refracción de los solventes y la línea de base cambia continuamente. Los sistemas que comprenden operaciones de cambio en la dirección del caudal (contracorriente) se utilizan habitualmente para lograr la elución de todas las sustancias excesivamente retenidas en un pico único. Estas sustancias permanecen en la cabeza de la columna y eluyen únicamente al invertir la dirección del caudal.

Para lograr este efecto, puede operarse con una o con dos válvulas de dos posiciones según puede ilustrarse en la figura 9.4. En (1) está esquematizada la operación de contracorriente aplicada a una columna única mientras que en (2) se esquematiza la operación de contracorriente aplicada a un sistema compuesto por una guardacolumna y una columna analítica (o dos columnas analíticas), en este caso al invertirse la válvula la guardacolumna opera en contracorriente, pero en la columna analítica se mantiene la dirección en el caudal.

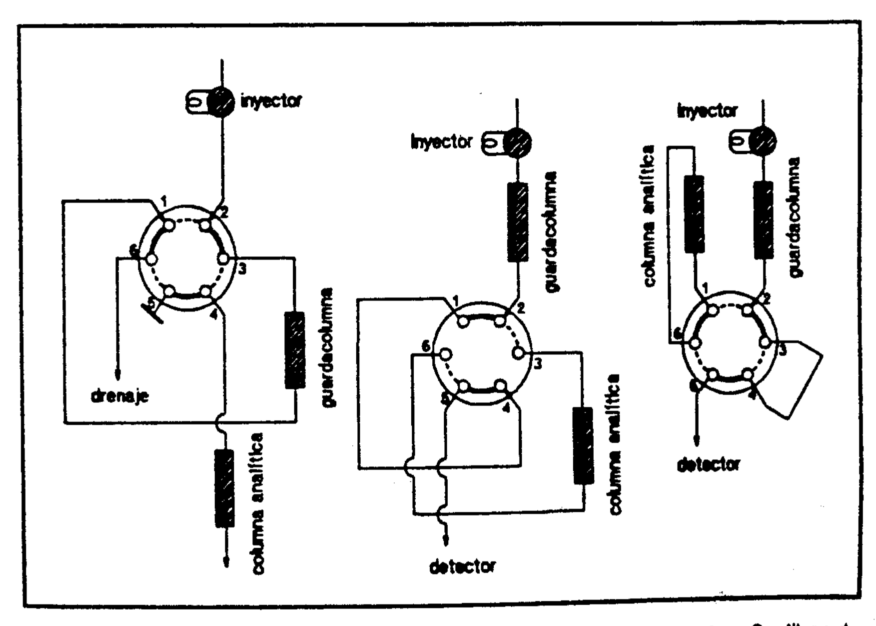


Fig. 9.6 Cromatografía de intercambio de columnas: Clean-up de las muestras. Gentileza de Rheodyne Inc.

Esta modalidad cromatográfica fue aplicada por Suatoni y col[53] para el análisis de derivados de petróleo. En primer lugar, estos autores separaban los hidrocarburos en una columna de sílice activada utilizando alcanos como fases móviles esperando el tiempo suficiente como lograr la elución de las parafinas y todas las olefinas. En estas condiciones las sustancias aromáticas, muy polares, quedan retenidas en la cabeza de la columna analítica y pueden eluirse como un pico simple invirtiendo la dirección del caudal. Alfredson[54] reportó un sistema similar utilizando hexano como fase móvil en una columna de sílice y otra de ciano (figura 9.5).

Clean up de las muestras

La preparación de las muestras en la misma línea del sistema cromatográfico (**on line**) puede efectuarse con la combinación apropiada de una válvula, una guardacolumna (o columna) y una columna analítica. Fundamentalmente estas preparaciones comprenden la retención del analito utilizando una fase móvil débil en una guardacolumna o columna secundaria, el lavado de la misma, y la elución posterior utilizando un solvente más fuerte. En la figura 9.6 se esquematizan varias configuraciones de válvulas que permiten efectuar esta operación.

La preparación de las muestras on line puede realizarse utilizando un inyector operando al mismo tiempo como inyector y como válvula de intercambio[55]. En este caso se coloca una pequeña columna (similar a una guardacolumna) denominada **loop-columna** cuyas dimensiones son aproximadamente 4.6 mm ID y 30 mm de longitud en el mismo loop del inyector. Si se desea concentrar sustancias que se retienen favorablemente en esta columna, desde el mismo inyector en su posición de carga pueden pasarse varios mililitros de solución muestra, con la ayuda de una jeringa. En esta misma posición es posible lavar la columna con solventes débiles. La elución se logra moviendo la válvula a la posición de inyección utilizando como fase móvil un solvente más fuerte. Estas pequeñas columnas están rellenas con los materiales convencionales de fase reversa, normal o intercambio iónico de partículas porosas de 10 µm de tamaño. Voelter y col[56] utilizaron un loop-columna de RP-8 para efectuar el clean up de muestras biológicas en las que se determinó aminoantipirina, metilaminoantipirina, antipirina, acetilaminoantipirina y formilaminoantipirina. Estos autores combinaban la metodología de clean up de las muestras, con la operación en contracorriente y el enriquecimiento. Conley y Benjamin[58] utilizaron este tipo de loop-columna para analizar corticoesteroides en cremas farmaceúticas.

Roth y col[57] introdujeron un sistema para inyectar directamente en el equipo de HPLC muestras de origen biológico conteniendo proteínas. El sistema comprende dos cromatógrafos operando en paralelo. El primero utiliza una columna corta que puede ser armada por el analista y se emplea para la limpieza de las muestras, en ese sistema fluye un solvente acuoso que permite que las proteínas pasen sin modificaciones a través de la columna mientras que se retiene el analito. En el segundo instrumento se bombea la fase móvil a través de la columna y, en un momento determinado, los dos sistemas se

interconectan. La fase móvil fluye a través de la primer columna y el analito eluye para ser detectado.

Métodos de enriquecimiento

Los métodos de enriquecimiento comprenden un proceso de concentración del analito en el mismo equipo cromatográfico seguido de alguna modalidad de preparación de las muestras. Por ese motivo para efectuarlo pueden utilizarse sistemas similares a los indicados para la preparación de las muestras en la figura 9.6. La diferencia esencial entre ambos reside en el volumen de muestra introducido. Volúmenes grandes implican métodos de enriquecimiento mientras que volúmenes pequeños indican métodos de preparación de las muestras. Van Vliet y col[59] concentraron en una guardacolumna de C18 los ésteres ftálicos presentes en 50 ml de muestra, logrando posteriormente su elución con un gradiente de solventes desde agua hasta metanol. Voelter y col[56] concentraron las sustancias presentes en los fluidos biológicos en un loop-columna inyectando entre 50 y 1000 µl de muestra.

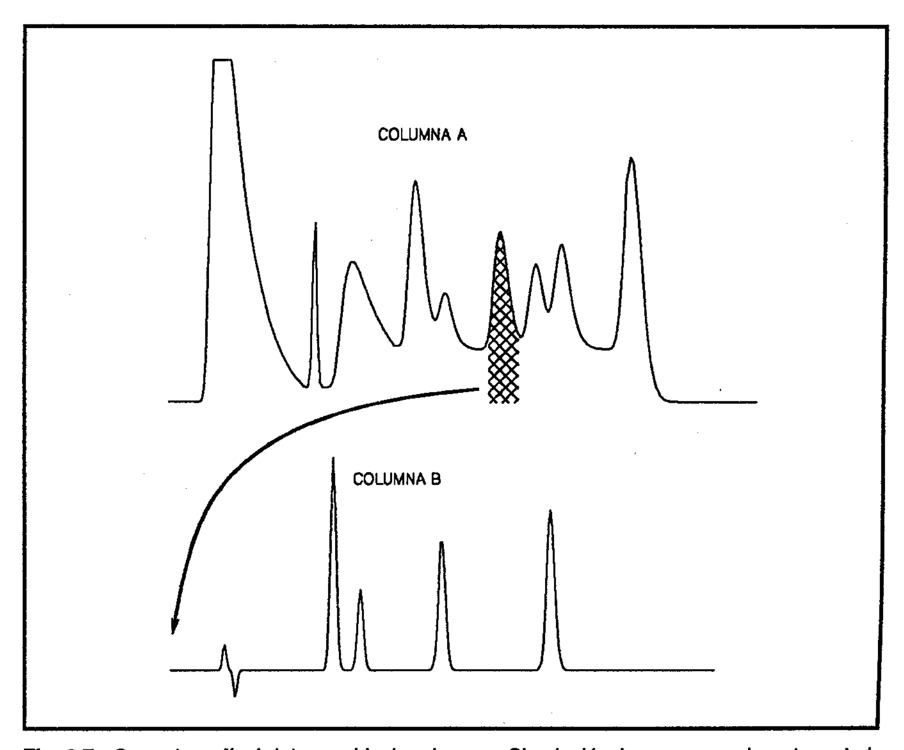


Fig. 9.7 Cromatografía de intercambio de columnas: Simulación de un proceso de corte central.

Metodologías de corte

Las metodologías de corte son diferentes modalidades del clean up de la muestra que involucran la selección de una parte del cromatograma que se deriva o bien hacia otra columna para su separación o bien hacia el detector. Dependiendo de la porción que se seleccione del cromatograma el corte se llamará **frontal, central** o **final**. El corte se denomina frontal cuando se selecciona la zona de los primeros picos, central si se selecciona la zona intermedia y final si se selecciona la última porción del cromatograma. En la figura 9.7 se ilustra una simulación de un proceso de corte central.

Erni y col[68] reportaron la utilización de una metodología compleja para el análisis de varias drogas con sus metabolitos en plasma, orina y alimentos. Estos autores determinaron endralazina y endralazina piruvato aisladas del plasma u orina por medio de una extracción de pares iónicos (sección 9.2). La metodología comprende un método de corte central para la orina, y un método de corte frontal para el plasma seguido de una inversión del caudal (contracorriente).

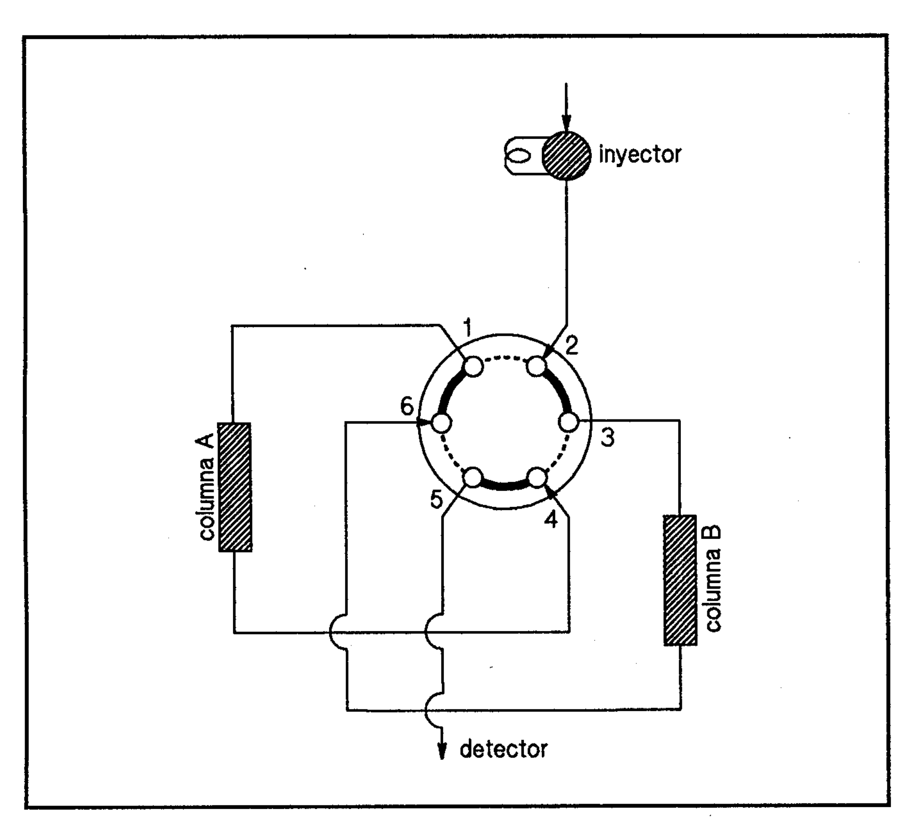


Fig. 9.8 Cromatografía de intercambio de columnas: Reciclo.

Cromatografía de reciclo

La cromatografía de reciclo comprende el pasaje de una porción del cromatograma varias veces a través de una columna con el objeto de incrementar la eficiencia de la separación. Esta modalidad fue descrita por Snyder y col[60],y Martin y col[61].

En la figura 9.8 se ilustra un sistema para realizar una cromatografía de reciclo que utiliza una válvula de dos posiciones y dos columnas de las mismas características. El eluyente de una columna (eluyente total, o cualquier fracción que se seleccione) puede transferirse directamente a la otra sin que se produzca ensanchamiento apreciable de la banda cromatográfica. Esta técnica permite alcanzar la eficiencia de varias columnas en serie con la presión de solamente dos. Este hecho tiene poca importancia en fase reversa, donde la separación entre componentes se alcanza modificando las propiedades químicas de la fase móvil y la eficiencia de la columna tiene una importancia secundaria. En cambio, en la cromatografía por tamaño molecular (SEC) la separación entre dos sustancias depende únicamente de la eficiencia de la columna y de la diferencia de pesos moleculares entre ellas. Por ende, en este caso en particular, si las sustancias que se desean separar tienen pesos moleculares muy próximos una cromatografía de reciclo puede ser de gran utilidad.

Cromatografía multidimensional

La cromatografía multidimensional es un modo de HPLC en el cual una mezcla de sustancias o parte de ellas se separa en forma secuencial en dos o más columnas conteniendo diferentes rellenos[62]. Para realizarla se suelen conectar varias columnas en serie por medio de una o varias válvulas de intercambio. La diferencia fundamental que existe entre la cromatografía multidimensional y la cromatografía de intercambio de columnas es que la primera comprende la utilización de varios modos cromatográficos en una sola corrida, e inclusive comprende el acoplamiento entre sistemas cromatográficos diferentes, mientras que la segunda puede, simplemente, referirse a un cambio de dirección del líquido fluyente.

La conexión de varias columnas en serie es el modo más complejo de la cromatografía de intercambio de columnas y, tal vez, el menos explorado. Freeman[63] ha demostrado que existe un incremento exponencial en el número de picos a separar si se utilizan diferentes modos de HPLC acoplados o diferentes columnas de una misma modalidad colocadas en serie. El ensanchamiento de banda que estos sistemas pueden llegar a producir puede manejarse con una prudente selección de las condiciones de operación. De todas maneras, en estos casos resulta conveniente evaluar la compatibilidad de los solventes a utilizar en cada modalidad. Es así, que si se utiliza una combinación entre fase reversa y normal se debe poner un sistema intermediario que permita eliminar el agua proveniente del primero.

Varios autores[64,65] utilizaron la cromatografía multidimensional combinando los modos de exclusión y afinidad para la preparación y clean up de muestras en matrices complejas. Así, Apffel y col[64] utilizaron la cromatografía de exclusión molecular para realizar el

clean up de las muestras, y luego realizaban un corte central para derivar parte de la muestra inyectada hacia una columna que operaba o bien en fases normal o reversa, o bien en intercambio iónico. Con este sistema reportaron la determinación de teofilina y cafeína en fluidos biológicos, catecolaminas en orina, vitaminas en alimentos y azúcares en melazas y caramelos. Johnson y col[65] combinaron la exclusión molecular y la fase reversa, y aplicaron esa combinación a la determinación de aditivos en el caucho y malation en tomate.

Dolphin y col[66] desarrollaron un sistema muy complejo para la determinación de pesticidas y grasas en leche combinando el intercambio de columnas con la operación en contracorriente. Para la detección de las sustancias grasas utilizaban un refractómetro, mientras que para la detección de los pesticidas un detector de captura de electrones con un límite de detección de 0.1 ppm. Lecaillon[67] determinó sustancias de polaridad baja, media o alta en plasma y orina utilizando combinaciones de hasta tres columnas operando en el modo de corte central.

9.5 Derivatización

La derivatización se refiere a la reacción química que se produce entre el analito y un reactivo determinado ya sea dentro o fuera del equipo cromatográfico. Si se efectúa antes de inyectar la muestra dentro del cromatógrafo, la derivatización se denomina **pre-columna** y los derivados ya formados se separan en la columna cromatográfica. También puede realizarse después de inyectar la muestra, en cuyo caso se denomina **post-columna.** Esta última se efectúa separando al analito en la columna y luego mezclando el eluyente

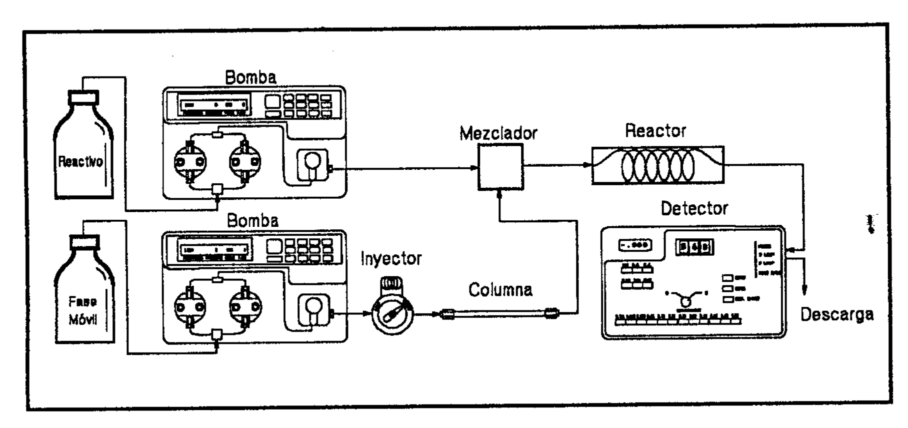


Fig.9.9 Esquema de un equipo de HPLC para operar con derivatización post-columna.

de la columna con un reactivo apropiado en la misma línea del cromatógrafo, antes de efectuarse la detección (figura 9.9).

La selección de un método de derivatización pre o post-columna depende principalmente de la velocidad de la reacción y de la compatibilidad de la reacción (y los reactivos) con la fase móvil empleada. En general, existen varios motivos para derivatizar los diferentes analitos, como ser:

- **Mejorar la detección** Esta es la causa más importante por la cual se producen derivatizaciones químicas en HPLC. Se origina en la falta de detectores universales que posean la sensibilidad adecuada. El detector de índice de refracción es universal pero no es lo suficientemente sensible, mientras que tanto el detector UV como el de fluorescencia son sensibles pero no universales. Por lo cual muchos compuestos que no poseen grupos cromóforos o fluoróforos no pueden ser detectados. Así, por ejemplo existen sustancias de gran interés analítico que no absorben al UV como los ácidos grasos (los ácidos carboxílicos en general) y los aminoácidos. Estas sustancias deben derivatizarse para poder detectarse por HPLC. En el primer caso, los ácidos carboxílicos reaccionan con haluros de fenacilo para dar los ésteres fenacilados correspondientes (figura 9.10)

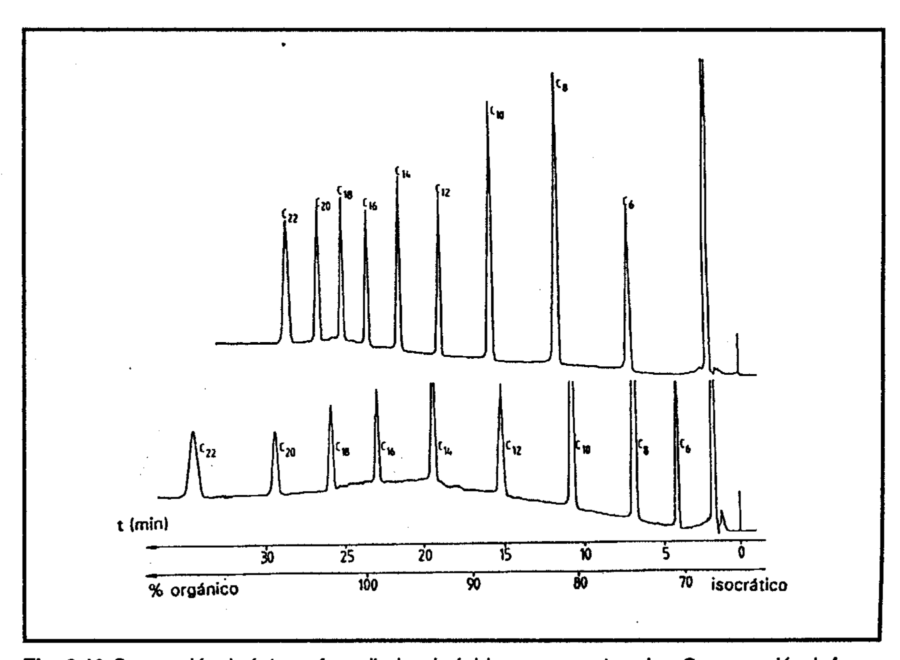


Fig. 9.10 Separación de ésteres fenacilados de ácidos grasos saturados. Comparación de fases móviles con metanol (superior) y acetonitrilo (inferior), ambos en gradiente. De referencia 91 con permiso del editor.

$$X\text{-}C_6H_4\text{-}C(=O)\text{-}CH_2Br \; + \; R\text{-}COOH \longrightarrow X\text{-}C_6H_4\text{-}C(=O)\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}C(=O)\text{-}R$$

X = $-H$; $-Br$; $-Cl$; $-NO_2$

Estos derivados se forman en un medio anhidro (DMF o acetona), se incuban algunos minutos y luego se inyectan en el HPLC, detectándolos al UV a 260 nm.

En el caso de lo aminoácidos existe una amplia gama de reactivos de derivatización

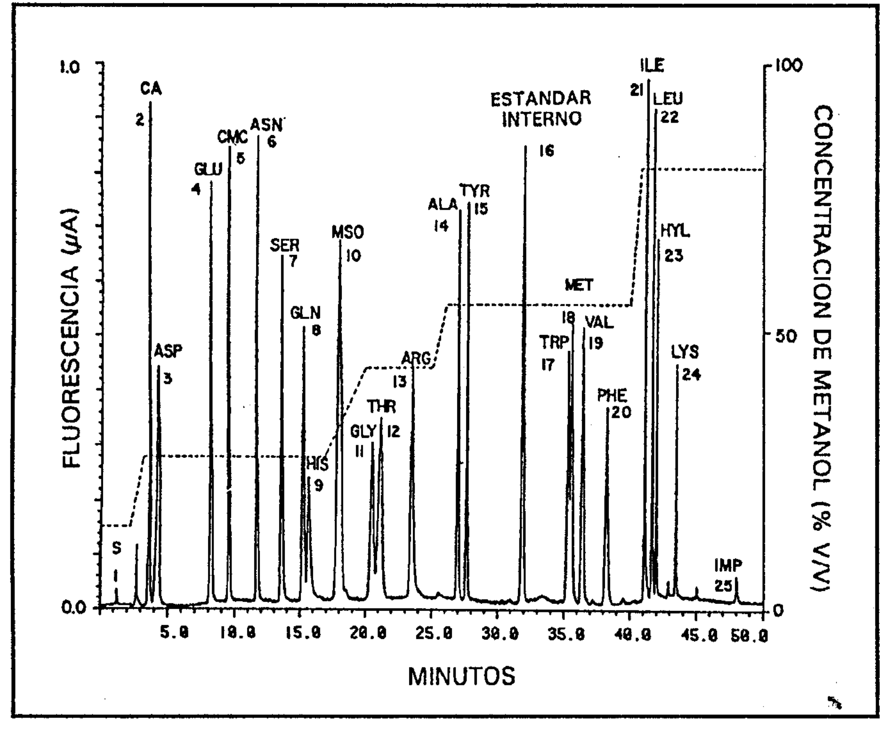


Fig. 9.11 Separación de aminoácidos como OPTA derivados. Columna: Ultrasphere ODS, caudal: 1,5 ml/min. Solvente A: THF-0.05 M Sodio Acetato pH 6,6 (1:99). Solvente B: Metanol. Detector: Fluorescencia: Ex 330 nm. Emisión 418 nm. De referencia 108 con autorización del editor.

dirigidos al grupo amino o al grupo carboxilo. Habitualmente se derivatiza el grupo amino para producir derivados fluorescentes. Tal es el caso del o-ftalaldehído que, en presencia de un reductor (ß-mercaptoetanol o etanodiol), reacciona con las aminas primarias produciendo un isoindol sustituído que puede detectarse con fluorescencia (Ex 229 nm, Em 470 nm):

$$C_6H_4(CHO)_2 + R-CH(COOH)-NH_2 \xrightarrow{HS-CH_2-CH_2-OH} \text{isoindol}(S-CH_2-CH_2OH)-N-CH(COOH)-R$$

Esta reacción se ha utilizado con éxito en numerosos trabajos para la detección de aminoácidos (figura 9.11). Es muy rápida (sólo algunos segundos) y no se ve afectada por la presencia de agua, por lo cual puede realizarse tanto en la modalidad pre como post-columna.

- **Mejorar la selectividad** En este caso la derivatización se utiliza para separar compuestos que, de otra manera, o bien no se pueden separar o bien la separación resulta muy compleja. La derivatización para mejorar la selectividad es muy rara en HPLC, dado que una adecuada combinación de fases estacionaria y móvil puede resolver sin dificultades las mayoría de las separaciones.
  Un caso especial se refiere a la separación de isómeros ópticos[69-73]. Como los enantiómeros no poseen propiedades diferentes entre sí, salvo las que se refieren a su comportamiento frente a la luz polarizada, difícilmente puedan separarse por algún sistema cromatográfico. En este caso, y para lograr la separación, los enantiómeros se derivatizan con reactivos estereoespecíficos para formar los correspondientes diasteroisómeros, siendo estos últimos sustancias más simples de ser separadas.
- **Permitir la cromatografía** El último argumento a favor de la derivatización se relaciona raramente con la HPLC, y resulta ser el de mayor importancia en GC.

Derivatización pre-columna

Una de las mayores ventajas de la derivatización pre-columna reside en el hecho que no existen limitaciones en cuanto a la cinética de la reacción. Es decir, que puede esperarse todo el tiempo que sea necesario como para completar la reacción sin ningún detrimento en el resultado cromatográfico. Adicionalmente, puede utilizarse un gran exceso de reactivo, y no es imprescindible que el reactivo no interfiera en la detección de la sustancia

porque puede eliminarse en un paso previo o separarse en la misma corrida cromatográfica. La última ventaja de estos sistemas reside en que no existen limitaciones en cuanto a la selección de los solventes que componen la fase móvil. El agua, por ejemplo, suele retardar reacciones o hidrolizar reactivos, por lo cual no puede utilizarse como componente de las fases móviles de ciertas metodologías post-columna. En cambio puede utilizarse para separar los mismos derivados, si éstos se han preparado mediante una derivatización pre-columna.

La mayor desventaja de los sistemas pre-columna reside en la posible aparición de picos espurios provenientes de derivados no deseados, varios derivados de una sola sustancia, o en la descomposición química de los derivados ya formados. Esto conduce a la aparición de uno o más picos para una sola sustancia a analizarse por lo cual se complica enormemente el sistema cromatográfico. Así, por ejemplo, Frei[74] reportó que en la reacción de la adrenalina con cloruro de dansilo, se producía un derivado fluorescente cuya fluorescencia aumentaba un 50 % en 25 min. El cloruro de dansilo es un reactivo que reacciona con las aminas primarias y los fenoles para dar derivados fluorescentes. El mismo autor determinó que el incremento en la fluorescencia se debía a que la adrenalina forma un derivado tri-dansilado y a que éste al estar muy impedido estéricamente, se dimeriza al ser irradiado.

Derivatización post-columna

La derivatización post-columna comprende la reacción química del analito en el mismo equipo de HPLC. Esta reacción se realiza después de la separación cromatográfica en dispositivos denominados **detectores de reacción** o simplemente **reactores**. En la figura 9.9 se esquematiza un equipo de HPLC para operar con derivatización post-columna. Este instrumento consta de los módulos habituales de un cromatógrafo convencional (bomba, inyector, columna y detector), conjuntamente con los módulos necesarios para realizar la reacción de derivatización en la línea del instrumento. En primer lugar se necesita una bomba de caudal constante y preferentemente libre de pulsos[75] para bombear el reactivo hacia el eluyente de la columna. Esta bomba opera en la zona de baja presión del instrumento por lo cual no necesita ser de alta presión. En segundo lugar se necesita un dispositivo en el cual pueda mezclarse íntima y rápidamente el líquido eluyente de la columna, este dispositivo de denomina **mezclador.** Finalmente, se necesita **un reactor** donde los analitos puedan reaccionar a temperatura controlada con el reactivo derivatizante.

La derivatización post-columna es un método muy rápido y simple de realizar en las determinaciones de rutina pero exige una dedicación especial durante el desarrollo analítico. Sus principales ventajas residen en que no es necesario completar la reacción y que tanto la posible descomposición de los derivados como la formación de derivados extraños no tiene incidencia sobre la performance de la metodología utilizada. Además puede aplicarse cuando los derivados, por sus características, son difíciles de cromatogra-

fiar. Si bien resulta un método muy apropiado para un gran número de determinaciones sus principales desventajas residen en la falta de compatibilidad que poseen muchas reacciones (o reactivos) con los solventes utilizados para preparar la fase móvil, y que no puede aplicarse a reacciones lentas. Otra de sus desventajas, seguramente tan limitante como las dos anteriores, es que el reactivo no debe presentar una señal de base apreciable en el sistema seleccionado para detectar al derivado.

Mezcladores

Los mezcladores, como su nombre lo indica, tienen la función de mezclar el eluyente de la columna cromatográfica con el reactivo para la derivatización. Para efectuar la mezcla suele utilizarse una pieza en T, aunque algunos autores[76] reportaron que en ese caso existen ensanchamientos adicionales del pico cromatográfico originados en defectos en el mezclado (efectos de capas) por las distintas densidades que habitualmente poseen los líquidos a mezclar. En tales casos los mismos autores recomiendan la utilización de mezcladores donde la salida de la columna, la salida hacia el reactor, y la entrada del reactivo formen diferentes ángulos. Otro tipo de mezclador fue reportado por Little y col[77]. Este dispositivo es a la vez mezclador y reactor del tipo empacado, consiste en una columna cromatográfica de 3 cm a la que se le incorpora una tubería lateral para la entrada de reactivo y un fritado que se coloca en la cabeza de la columna que se utiliza además como difusor.

Reactores

Para definir un método de análisis por derivatización post-columna de las muestras se debe conocer el tiempo necesario para completar la reacción. Las reacciones rápidas pueden realizarse con reactores que permitan tiempos de estadía cortos, mientras que las lentas requieren la utilización de reactores que permitan mayores tiempos de estadía. En general no es necesario que la reacción alcance su punto máximo, y puede operarse sin dificultad con reacciones incompletas. Esto se debe a que la detección se realiza siempre al mismo tiempo, aunque no se complete en su totalidad. Frei y col[76] utilizaron una derivatización post-columna con Fluram para la reacción de los grupos amino libres de varios péptidos como oxitocina, lisina-vasopresina y ornipresina. Estos autores trabajaban con reactores tubulares con tiempos de estadía de 10 segundos (85 % del total de la reacción), mientras que la reacción se completaba a los 50 segundos. En el caso particular de la oxitocina, era necesario quintuplicar el tiempo de estadía (y consecuentemente la dispersión de los picos) para incrementar sólo un 15 % del valor de su área. Pero, debido a la dispersión obtenida con tiempos de estadía mayores, la altura máxima se alcanzaba entre los 15 a 20 segundos. En esta separación se determinó que era muy importante que la espiral se encuentre libre de irregularidades. Como indican apropiadamente estos autores el aspecto más importante en la reproducibilidad de las derivatizaciones post-columna reside en la reproducibilidad del sistema cromatográfico utilizado.

Básicamente existen tres tipos de reactores: tubulares, empacados y de aire segmentado,

todos ellos se han descrito en la literatura[76-78]. La performance de los mismos se detallará a continuación:

- **Reactor tubular** El reactor tubular es el más simple de todos ellos, se utiliza para reacciones muy rápidas (hasta 30 segundos) y consiste en un tubo de acero doblado en espiral. Cuanto mayor sea la longitud de esta espiral, mayor será el tiempo de estadía del analito en el mismo, pero también se incrementará el ancho del pico y la presión del sistema cromatográfico. Delder y col[79] demostraron que el ensanchamiento de la banda cromatográficas disminuía en la espiral respecto del tubo recto debido a una mejor mezcla radial. Frei y col[76] reportaron que el ensanchamiento de la banda cromatográfica aumentaba linealmente con el aumento en la longitud del tubo capilar donde se realiza la reacción, este ensanchamiento era a un caudal de 1.5 ml/min de, aproximadamente, 7 % por cada 0.5 ml de volumen de tubería agregada. En trabajos posteriores el mismo autor[74] indicó que el tiempo de estadía máximo para estos reactores era de 30 segundos ya que con una reacción de 1 minuto, a un caudal de 2 ml/min se obtiene un ensanchamiento de banda de 28 % (valor que resulta inaceptable desde el punto de vista práctico).
  La Fluorescamina (Fluram) y el OPA (o-ftalaldehído) son reactivos utilizados para el análisis de aminas primarias[76,80-86] que se utilizan en derivatizaciones del tipo pre y post-columna. En el último caso, debido a la rapidez con la cual se alcanza el máximo de la reacción, se pueden utilizar reactores del tipo tubular. Ambos reactivos producen derivados fluorescentes con límites de detección muy bajos, del orden de los picomoles.

- **Reactor empacado** El reactor empacado, también denominado reactor de lecho, se utiliza en reacciones de cinética intermedia, cuyos tiempos de reacción se encuentren entre 30 segundos y unos 5 minutos. Delder y col[79] demostraron que el ensanchamiento de banda producido por estos reactores era menor que el producido por los reactores tubulares.
  El reactor empacado consiste en una columna cromatográfica, típicamente de 4 mm de ID x 30 cm de longitud, que opera en condiciones de no-retención, es decir en el volumen muerto. Para ello se lo suele rellenar con esferas inertes (de vidrio o PTFE) de diferentes tamaños.
  Tomando el ejemplo de ensanchamiento de 28 % en reactores tubulares indicado en el punto anterior para una reacción de 1 minuto, el mismo autor[74] indicó que el ensanchamiento en un reactor empacado era de sólo 5 %.

- **Reactor de aire segmentado** Este reactor posee un diseño mucho más complejo que los descritos anteriormente y puede aplicarse a reacciones más lentas (entre 5 y 30 minutos). Consiste en un tubo largo de diámetro pequeño donde el eluyente de la columna se segmenta con burbujas de aire (u otro gas). El objeto de esta segmentación es reducir la difusión de los solutos en la tubería y, consecuentemente, evitar el ensanchamiento de la banda cromatográfica. El factor probablemente más crítico en

ese punto es el sistema de deaireado del caudal de líquido.
Este tipo de reactor, debido a su complejidad de diseño y a que puede aplicarse a reacciones más lentas (de hecho la mayoría de ellas) se utiliza en los equipos de análisis automático. Carlquist y Westerlung[87] han utilizado este tipo de reactores para la determinación de sustancias que contienen el anillo penicilánico intacto.

Aplicaciones

La derivatización en HPLC tiene innumerables aplicaciones, principalmente en el área bioquímica con el análisis de péptidos, aminoácidos y aminas biológicas. En la tabla 9.VI hemos recopilado las derivatizaciones de uso más común, en función del grupo de la molécula que se derivatiza.

Grupo Funcional	Derivatización		Detección	Ref
	Reactivo	Tipo		
Ac Carboxílicos	Haluro de Fenacilo	pre	UV 260 nm	88-93
	Bromometilmetoxicumarina	pre	Fluorescencia	94
Alcoholes Fenoles/tioles	Haluro de Benzoílo	pre	UV 260 nm	95,96
	Fenilisotiocianato	pre	UV 240 nm	97.98
Aldehídos y Cetonas	Dinitrofenilhidrazina	pre	UV 430 nm	99,100
	Dansilhidrazina	pre	Fluorescencia	101
Aminas	Fenilisotiocianato	pre	UV 254 nm	102-104
	Cloruro de Dansilo	pre	Fluorescencia	105-106
	o-ftalaldehído	pre post	Fluorescencia	80,85,86 107,108
	Fluorescamina	pre post	Fluorescencia	76,77,80, 84 109,110,111
Aminas Terciarias	Naftil cloroformiato	pre	Fluorescencia	112

Tabla 9.VI Reactivos de derivatización para incrementar la detección en HPLC

Referencias

1. Lawrence J.F., Anal. Chem. 52, 1122 A, (1980)
2. Henry R.J., Cannon D.C., Winkelman J.W., "Química Clínica; Bases y Técnicas" Ed Jims, Tomo 1, (1979)
3. Blanchard J., J. Chromatogr. 226, 455, (1981)
4. Schantz M.M., Chester S.N., J. Chromatogr. 363, 397, (1986)
5. Hawthorne S.B.,Miller D.J., Anal. Chem. 59, 1705, (1987)
6. Schaefer K., Baumann W., Fresenius Z., Anal. Chem. 332, 884, (1989)
7. Alexandrou N., Pawliszyn J., Anal. Chem. 61, 2770, (1989)
8. Richards M., Campbell R.M., LC-GC 9, 358, (1991)
9. Majors R.E., LC-GC 9, 16, (1991)
10. Eksborg S., Ehrsson H., Lönroth V., J. Chromatogr. 185, 583, (1979)
11. Marckell C., Hagen D.F., Bunnelle V.A., LC-GC 9, 332, (1991)
12. Dressler M., J. Chromatogr. 165, 167, (1979)
13. Wainer I., "Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development" Aster Publishing Corporation, 1985
14. Schulten H.R., Soldati F., J. Chromatogr. 212, 37, (1981)
15. U.S. EPA Method N° 525, (1988)
16. Block W., Pingoud A., Fresenius Z., Anal. Chem. 301, 109, (1980)
17. Edlund P.O., J. Chromatogr. 187, 161, (1980)
18. Gauch R., Leuenberger U., Baumgartner E., J. Chromatogr. 178, 543 (1979)
19. Harzer K.,Barchet R., J. Chromatogr. 132, 83, (1977)
20. Leuenberger U., Gauch R., Baumgartner E., J. Chromatogr. 173, 343, (1979)
21. Leuenberger U., Gauch R., Baumgarter E., J. Chromatogr. 161, 303, (1978)
22. Black D.B., Lawrence R.C., Lovering E.G., Watson J.R., J. Assoc. off Anal. Chem. 64, 1474, (1981)
23. Chao G.K., Suatoni J.C., J. Chromatogr. Sci. 20, 436, (1982)
24. Riggin R.M., Howard C.C., Anal. Chem. 51, 210, (1979)
25. Bushway R.J., J. Chromatogr. 211, 135, (1981)
26. Cochrane W.P., Lanouette M., Trudeau S., J. Chromatogr. 243, 307, (1982)
27. Hu L.a., Ansari G.A.S., Moslen M.T., Reynolds E.S., J. Chromatogr. 241, 419, (1982)
28. May W.E., Wise S.A., Anal. Chem. 56, 225, (1984)
29. Subden R.E., Brown R.G., Noble A.C., J. Chromatogr. 166, 310, (1978)
30. Stepherd M.J., Holmes M., Gilbert J., J. Chromatogr. 354, 305, (1986)

31. Wachob G., LC Liq. Chromatogr. HPLC Mag. 1, 428, (1986)
32. Diebold G.J., Karny N., Zare R.N., Anal. Chem. 51, 67, (1979)
33. Paschal D.C., Needham L.L., Rollen Z.J., Liddle J.A., J. Chromatogr. 177, 85, (1979)
34. Thean J.E., Lorenz D.R., Wilson D.M., Rodgers K., Gueldner R.C., J. Assoc. off Anal. Chem. 63, 631, (1980)
35. Lim K.L., Young R.W., Driskel J.A., J. Chromatogr. 188, 285, (1980)
36. Finley J.W., Duang E., J. Chromatogr. 207, 449, (1981)
37. Buslig B.S., J. Chromatogr. 247, 193, (1982)
38. Terada H., Sakabe Y., J. Chromatogr. 291, 453, (1984)
39. Terada H., Sakabe Y., J. Chromatogr. 346, 333, (1985)
40. Pietta P., Mauri P., Rava A., J. Chromatogr. 356, 212,(1986)
41. D'Souza J.D., Ogilvie R.I., J. Chromatogr. 232, 212, (1982)
42. Palmisano F., Cataldi T.R.I., Zambonin P.G., J. Chromatogr. 344, 249, (1985)
43. Street J.M., Trafford D.J.H., Makin H.L.J., J. Chromatogr. 343, 155, (1985)
44. Nondek L., Chvalovsky V., J. Chromatogr. 268, 395, (1983)
45. Rouan M.C., Abadie F., Leclerc A., Juge F., J. Chromatogr. 275, 133, (1983)
46 - Parrott K.A., J. Chromatogr 274, 171, (1983)
47. Huber J.F.K.,Van der Linden R.,Ecker E, Oreans M., J. Chromatogr. 83 267 (1973)
48. Huber J.F.K.,Eisenbeiss F, J. Chromatogr. 149 127 (1978)
49. Harvey M.C., Stearns S.D., LC 1 (3), May (1983)
50. Willmont F.W., Mackenzie I., Dolphin R.J., J. Chromatogr. 167, 31 (1978)
51. Technical Notes 3. Rheodyne Inc. June (1980)
52. Esquivel B., Rothman L.D., Congreso Latinoamerinano de Cromatografía, Buenos Aires, (1989)
53. Suatoni J.C., Garber H.R., Davis B.E., J. Chromatogr. Sci. 13, 367 (1975)
54. Alfredson T.V., J. Chromatogr. 218, 715, (1981)
55. Technical Notes 2. Rheodyne Inc. January (1980)
56. Voelter W., Kronbach T., Zech K., Huber R., J. Chromatogr. 239, 475, (1982)
57. Roth W., Beschke K., J. Chromatogr. 222, 13 (1982)
58. Conley D.L., Benjamin E.J., J. Chromatogr. 257, 337, (1983)
59. Van Vliet H.P.M., Bootsman Th.C., Frei R.W., Brinkman U.A.Th., J. Chromatogr. 185, 483, (1979)
60. Snyder L.R., Dolan J.W., Van der Wal S.J., J. Chromatogr. 203, 3 (1981)
61. Martin M., Verillon F., Eon C., Guiochon G.J., J. Chromatogr. 125, 17, (1976)
62. Miller R.L., Ogan K.,Polle A.F. American Lab. 57, 36, (1981)

63. Freeman D.H., Anal. Chem. 53, 2, (1981)
64. Apffel J.A., Alfredson T.V., Majors R.E., J. Chromatogr. 206, 43, (1981)
65. Johnson E.L., Gloor R., Majors R.E., J. Chromatogr. 149, 571, (1978)
66. Dolphin R.J.,Willmont F.W.,Mills A.D.,Hoogeveen L.P.J., J. Chromatogr. 122, 259, (1976)
67. Lecaillon J.B., Febre N., Souppart C., J. Chromatogr. 317, 493, (1084)
68. Erni F.,Keller H.P., Morin C., Schmidt M., J. Chromatogr. 204, 65, (1981)
69. Goto J., Goto N., Nambara T., J. Chromatogr. 239, 559, (1982)
70. Kinoshita T., Kasahara Y., Nimura N., J. Chromatogr. 210, 77, (1981)
71. Goto J., Hasegawa M., Nakamura S., J. Chromatogr. 152, 413, (1978)
72. Scott C.G., Peltrin M.J., Mc Corkle T., J. Chromatogr. 125, 177, (1976)
73. Nimura N., Ogura H., Kinoshita T., J. Chromatogr. 202, 375, (1980)
74. Frei R.W., J. Chromatogr. 165, 75, (1979)
75. Frei R.W., Res. Development, February, 42, (1977)
76. Frei R.W., Michel L.,Santi W., J. Chromatogr. 142, 261, (1977)
77. Lillte C.J., Whatley J.A., Dale A.D., J. Chromatogr. 171, 63, (1979)
78. Frei R.W., Scolten A.H.M.T., J. Chromatogr. Sci. 17, 152, (1979)
79. Delder R.S., Kroll M.G.F., Beeren A.J.B., van den Berg J.H.M., J. Chromatogr. 149, 669, (1978)
80. Roth M., Anal. Chem. 43, 880, (1971)
81. Fouere J., Jensen H., Neuzil E., Anal. Chem. 48, 155, (1976)
82. De Silva J.A.F., Shojny N., Anal. Chem. 47, 714, (1975)
83. Voelter W., Zech K., J. Chromatogr. 112, 743, (1975)
84. Frei R.W., Michel L., Santi W., J. Chromatogr. 126, 665, (1976)
85. Creaser E.H., Hughes G.J., J. Chromatogr. 114, 69, (1977)
86. Lund E., Thomsen J., Brunfeldt K., J. Chromatogr. 130, 51, (1977)
87. Carlquist J., Westerlung D., J. Chromatogr. 164, 373, (1979)
88. Durst H.D., Milano M., Kikta E.J., Connolly S.A., Grushka E., Anal. Chem. 47, 1797, (1975)
89. Grushka E., Durst H.D., Kikta E.J., J. Chromatogr. 112, 673, (1975)
90. Hoffman N.E., Liao J.C., Anal. Chem. 48, 1104, (1976)
91. Engelhardt H., Elgass H., J. Chromatogr. 158, 249, (1978)
92. Patience R.L., Thomas J.D., J. Chromatogr. 249, 183, (1982)
93. Patience R.L., Thomas J.D., J. Chromatogr. 243, 225, (1982)
94. Lam S., Grushka E., J. Chromatogr. 158, 207, (1978)
95. Schwarzenbach R., J. Chromatogr. 140, 304, (1977)

96. Frei R.W., J. Chromatogr. 122, 293, (1976)
97. Björkquist B., J. Chromatogr. 218, 65, (1981)
98. Björkquist B., J. Chromatogr. 204, 105, (1981)
99. Carey M.A., Persingewr A.F., J. Chromatogr. Sci. 10, 537, (1972)
100. Selim S., J. Chromatogr. 136, 271, (1977)
101. Takeda M., Maeda M., Tsuji A., J. Chromatogr. 244, 377, (1982)
102. Elion J., Downing M., Mann K., J. Chromatogr. 155, 436, (1978)
103. Mathews E.W., Byfield P.G.H., Mac Intyre I.M., J. Chromatogr. 110, 369, (1975)
104. Abrahansson M., Gröningson K., Castenson S., J. Chromatogr. 154, 313 (1978)
105. Grego B., Hearn M.T.W., J. Chromatogr. 255, 67, (1983)
106. Yamke T., Nakai N., Nakamura H., J. Chromatogr. 104, 359, (1975)
107. Gehrke C.W., Gehrke C.W.Jr, Cunningham F.C., J. Chromatogr. 162, 293, (1979)
108. Umagat H., Kucera P., Wen L.F., J. Chromatogr. 239, 463, (1982)
109. Scholten A.H.T.M., Brinkman U.A.Th., Frei R.W., J. Chromatogr. 218, 3 (1981)
110. Walker S.E., Coates P.E., J. Chromatogr. 223, 131, (1981)
111. Sedman A.J., Gal J., J Chrom 232, 315, (1982)
112. Gübitz G., Wintersteiger R., Hartinger A., J Chrom 218, 51, (1981)

Capítulo 10

Análisis Cuantitativo

10.1 Introducción

La cromatografía líquida de alta performance, como cualquier otro método cromatográfico, es una herramienta sumamente útil para el análisis cuantitativo de mezclas de sustancias. El rápido crecimiento que este método analítico ha experimentado en las últimas décadas, si bien se debe a diversos factores, se basa fundamentalmente en la simplicidad con la cual se obtienen por HPLC resultados cuantitativos. Actualmente la HPLC es capáz de cuantificar tanto impurezas en muy bajas concentraciones como macrocomponentes con niveles de precisión tan bajos como 0.5 %, y aún menores. Como todo método de análisis cuantitativo, está compuesto de diversos pasos, cada uno de los cuales debe estudiarse apropiadamente. Estos son:

- Muestreo
- Preparación de la muestra
- Inyección de la muestra
- Separación Cromatográfica
- Detección
- Integración de la Señal
- Cálculo de la Concentración de Analito

En este Capítulo trataremos cada uno de ellos desde el punto de vista cromatográfico, de manera tal de ofrecer al lector una guía práctica para resolver los errores de cuantificación más comunes.

10.2 Muestreo

El muestreo es una etapa crítica en todo método de análisis. Los líquidos pueden muestrearse directamente, previa homogeneización y los sólidos o semisólidos deben someterse a algún procedimiento que permita asegurar que la muestra extraída sea representativa. De acuerdo a lo expresado por el comité de la ACS-SEAC[1], la operación de muestreo debe presentar, como mínimo, las siguientes características:

- Diseño estadístico apropiado que tenga en cuenta los objetivos del estudio, sus certezas e incertidumbres.
- Instrucciones para la recolección de las muestras, etiquetado, conservación y transporte para facilitar el análisis.
- Entrenamiento del personal en las técnicas de muestreo y en los procedimientos específicos.

La operación de muestreo ha sido detallada en la literatura[1-3] y no se refiere estrictamente a la cromatografía por lo cual no será tratada más extensamente en este libro.

10.3 Preparación de la muestra

La preparación de la muestra es una etapa muy importante dentro del análisis cuantitativo. Debido a la diversidad de situaciones que pueden presentarse dependiendo de la concentración de analito y la naturaleza de la matriz de la muestra se le ha dedicado un Capítulo aparte (Capítulo 9).

10.4 Inyección de la muestra

La inyección de la muestra líquida y homogénea dentro del cromatógrafo es una de las fuentes de error más importantes dentro de la HPLC. En general, cuanto mayor sea el volumen de inyección mejor será la precisión, aunque se debe tener en cuenta que, aumentándolo por encima de cierto valor, aumenta el ensanchamiento del pico causando una pérdida de eficiencia no adjudicable a la columna. La influencia del volumen de inyección en el ensanchamiento del pico cromatográfico ha sido detallado en la literatura[4].

Habitualmente, el volumen de inyección se selecciona de acuerdo a la longitud y diámetro de la columna que se desea utilizar, así, para la inyección de muestras disueltas en fase móvil, en columnas de 4 mm de diámetro interno, se utilizan como máximo los siguientes volúmenes:

- 100 µl en columnas de 25 cm de longitud
- 50 µl en columnas de 12.5 cm de longitud
- 20 µl en columnas más cortas

Se ha sugerido[5] que el volumen de inyección no debe ser mayor que el 20 a 30 % del volumen del primer pico de interés en el cromatograma. Evidentemente, la medición de volúmenes tan pequeños tiene un efecto muy importante dentro de la precisión del método de análisis, pero no resulta tan crítico como en cromatografía gaseosa donde los volúmenes son aún menores y la pérdida de muestra puede ser importante.

Tanto el diseño del inyector como la metodología empleada para la inyección cumplen un rol muy importante en la precisión del análisis. Como se ha visto en la sección 2.7, existen básicamente dos tipos de inyectores: los inyectores manuales y los automáticos. Utilizando un inyector manual la muestra puede introducirse en el sistema cromatográfico de tres diferentes modos: por llenado total del loop, por llenado parcial del loop, y por el método de la burbuja conductora.

Utilizando el método de **llenado total del loop**, éste se llena por completo con la muestra, y su contenido se transfiere al sistema. En este caso, existe una inexactitud en el volumen nominal (por ejemplo, un loop de 20 µl puede contener 19.5 ó 20.5 µl). Sin embargo, en

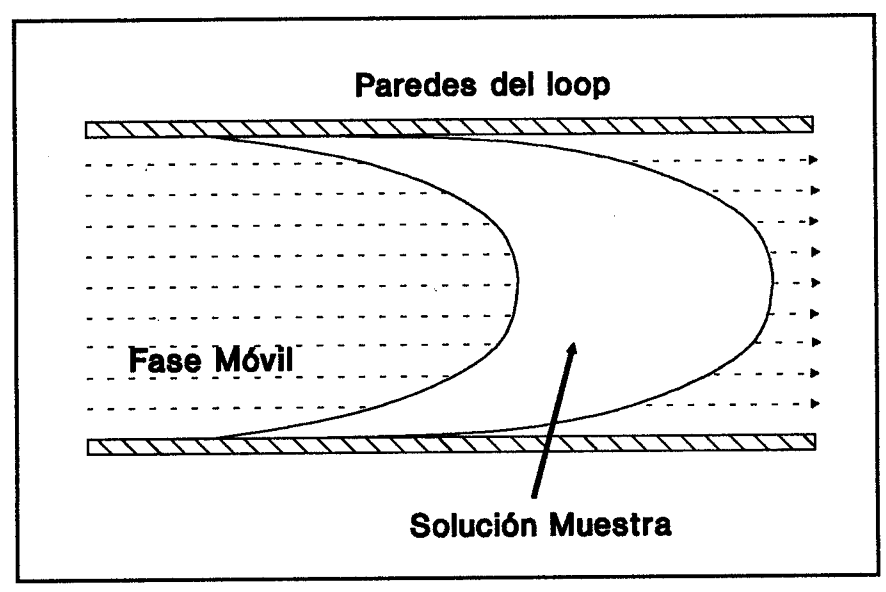


Fig. 10.1 Fenómenos de flujo laminar en tuberías. Obsérvese que las capas centrales migran mucho más rápidamente que las capas en contacto con las paredes de la tubería.

una medida comparativa entre una o más soluciones estándar y una solución muestra, como la que se efectúa habitualmente, esta diferencia de volumen no tiene ningún efecto en el resultado del análisis. Así, en estos inyectores la imprecisión debería depender únicamente de eventuales variaciones de temperatura, por el efecto que ésta tiene sobre la dilatación del loop y las soluciones entre inyecciones. Es claro que este error es mínimo, pero pueden existir también errores de procedimiento. Si consideramos que el líquido que circula en las tuberías del cromatógrafo se comporta de acuerdo a un flujo laminar, entonces, por rozamiento, las capas de líquido en contacto con las paredes del tubo se desplazan más lentamente que las capas ubicadas en el centro (figura 10.1). Como consecuencia, si se llena un loop de 20 µl con 20 µl o un poco más de muestra, cuando la cabeza de la solución inyectada eluya del loop, la cola tendrá fase móvil. Es así que se recomienda llenar el loop con no menos de 2 o 3 volúmenes nominales, preferentemente con 5 o 10 volúmenes para asegurar la máxima precisión[6]. Asimismo, para lograr un buen lavado del loop de muestra es recomendable mantener la manecilla del inyector en la posición de inyección una vez que la operación de inyección se ha completado. Con este método se han reportado precisiones en el orden del 0.05 %[7].

Si se utiliza la técnica de **llenado parcial del loop**, la imprecisión depende, indudablemente, de la precisión con la cual se mide un volumen determinado en una jeringa. Es claro que un operador experimentado puede conseguir buenos resultados midiendo con una jeringa, pero aún el mejor, no podría asegurar por apreciación visual el desplazamiento del émbolo en, por ejemplo ± 0.2 mm. Como referencia, una jeringa Hamilton

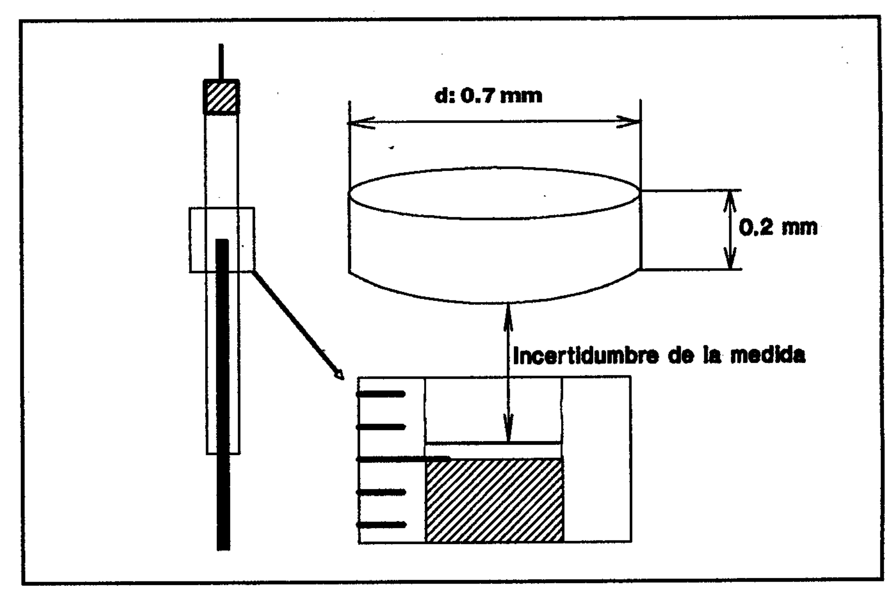


Fig. 10.2 Incertidumbre en la medida de un volumen determinado con una jeringa.

de 25 µl (P/N 848016) tiene una sección interna de 0.7 mm, mientras que una SGE de 50 µl (P/N 010927) tiene una sección interna de 1.1 mm. En la jeringa Hamilton la incertidumbre en la medida significa un volumen ($V = \pi.r^2.h$) de 0.077 µl (figura 10.2). Esto representa una imprecisión de 0.3 % si medimos 25 µl, y de 1.5 % si medimos 5 µl (en la jeringa SGE la incertidumbre en el volumen es de 0.19 µl lo cual implica aproximadamente 0.4 % para 50 µl y 1.9 % para 10 µl). Adicionalmente, estos inyectores también sufren la influencia de los fenómenos del flujo laminar. Por este motivo el loop no debe llenarse con más del 50 % de su volumen nominal para lograr una buena precisión. Con esta metodología se han reportado precisiones de 0.3 %[7].

El método **de la burbuja conductora** es, simplemente, una modificación del método de llenado parcial del loop, donde, luego de medir la cantidad exacta de la muestra con la ayuda de una jeringa, se carga una pequeña burbuja de aire. De esta manera al inyectar la muestra se evita la dispersión de los solutos y se mejora la eficiencia del sistema. La precisión, en este caso, depende igualmente de la habilidad del operador para medir pequeños volúmenes en una jeringa.

Finalmente, el mercado ofrece inyectores automáticos que operan con los principios de los inyectores manuales, con algunas diferencias entre sí. En general su precisión es mejor que la que presentan los equipos manuales porque no depende de la habilidad del operador.

Es una buena práctica de laboratorio controlar la precisión durante la inyección de estándares antes de inyectar las muestras de cada serie de análisis. Si esas determinaciones

demandan varias horas de corrida, la medida de la precisión debe realizarse tantas veces como sea necesario (típicamente 3 estándares luego de cada grupo de 5 muestras). Esta determinación forma parte del ensayo denominado de **Adecuación Cromatográfica** (System Suitability Test) que está especificado en la USP XXII. En este caso se requiere una precisión mínima de 2 % en la inyección de 5 estándares, aunque, otros autores[5] recomiendan una precisión mínima de 1.5 %.

10.5 Separación Cromatográfica

Otra fuente de error muy común se presenta en el proceso mismo de la cromatografía. Los errores cromatográficos resultan de la interacción del analito con el instrumento, de la descomposición del analito o de la separación en sí misma.

Afortunadamente, la **interacción del analito** con el equipo cromatográfico o con la fase móvil es un fenómeno bastante raro. De todas maneras, existen algunos casos donde se ha reportado la existencia de este tipo de problemas. Tal es el caso de las tetraciclinas y sus derivados, que suelen cromatografiarse con fases móviles a las que se agrega EDTA o citrato[8-10] para evitar que se complejen con el acero inoxidable de las tuberías, o de ciertas proteinas que disminuyen su actividad biológica en contacto con el acero. Si bien el fenómeno de complejación de las tetraciclinas con el acero ha sido minimizado por otros autores[11], la interacción de ciertas proteinas con las partes metálicas del instrumento presenta un inconveniente que, en muchos casos, es necesario corregir. Este último problema puede resolverse utilizando equipos en los que las partes metálicas en contacto con el soluto estén construidos de titanio o PTFE en lugar de acero inoxidable. Otra alternativa consiste en proteger a la proteina con el agregado de agentes quelantes como el EDTA a la fase móvil. En general, las proteinas son las sustancias más susceptibles a interaccionar tanto con el equipo cromatográfico como con la fase móvil. Así, en la cromatografía en fase reversa de proteinas se intenta que el contacto entre ésta y la columna sea lo menor posible, ya que el solvente de elución o la cadena alquílica del relleno de la columna pueden inducir a su desnaturalización o pérdida de actividad biológica.

Para evitar la interacción del analito con la fase móvil se utilizan solventes de baja reactividad, descartando "a priori" solventes muy reactivos como aldehídos o nitrocompuestos. De todas maneras pueden aparecer interacciones, aún con solventes tan "nobles" como el metanol. Tal es el caso de los ácidos orgánicos que, en presencia de metanol, en medio ácido fuerte pueden formar el éster metílico correspondiente (figura 10.3).

Existen igualmente otras sustancias que, por su labilidad, pueden degradarse en la soluciones de trabajo, tal es el caso del ácido fólico o de la benzodiacepina Ketazolam. El ácido fólico se oxida muy fácilmente por lo cual las soluciones a inyectar deben prepararse con un antioxidante (mercaptoetanol, ácido ascórbico) en el solvente de

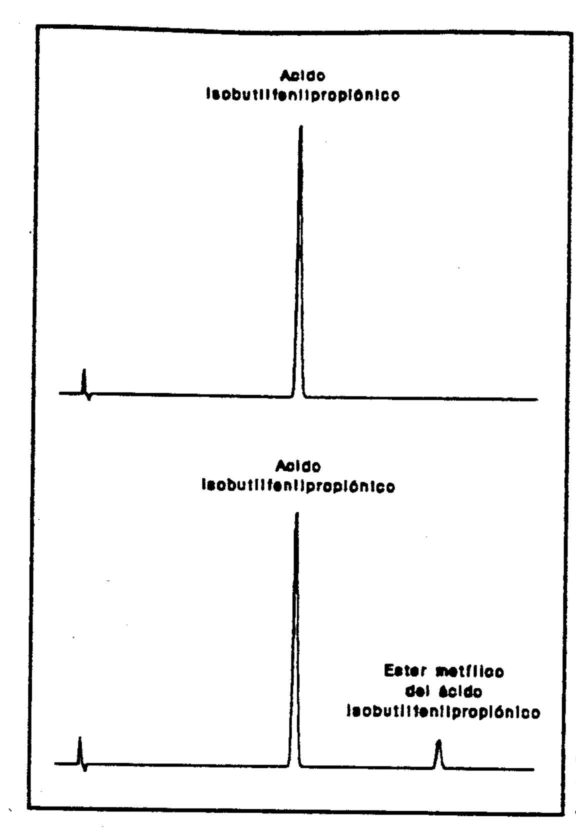


Fig. 10.3
Esterificación del ácido isobutilfenilpropiónico en medio ácido fuerte. Figura superior: ácido disuelto en metanol. Figura inferior: ácido disuelto en HCl metanólico. Columna C18 fase móvil : metanol : agua (70:30) con H_3PO_4

disolución[12-13]. El Ketazolam se hidroliza rápidamente a Diazepam en cualquier medio de disolución. En este caso, si se desea determinar Diazepam como impureza de Ketazolam puede inyectarse la muestra inmediatamente después de preparada, o bien efectuar la inyección en distintos tiempos medidos y extrapolar el contenido de Diazepam a tiempo cero (figura 10.4).

Para reconocer y aislar este tipo de fenómeno es conveniente estudiar la estabilidad del analito tanto en la fase móvil como en el solvente de disolución de la muestra. Estos ensayos se realizan, simplemente, dejando al analito en contacto con la fase móvil y con el solvente de disolución de la muestra por períodos de tiempo determinados en las condiciones habituales y extremas que puedan existir dentro del laboratorio analítico (presencia de luz solar, 30°C). Los resultados de las pruebas de estabilidad de la solución deben manejarse con mucho cuidado. Sólo debe descartarse una fase móvil que reaccione rápidamente con el analito ya que debe considerarse únicamente el tiempo de permanencia del mismo en la columna.

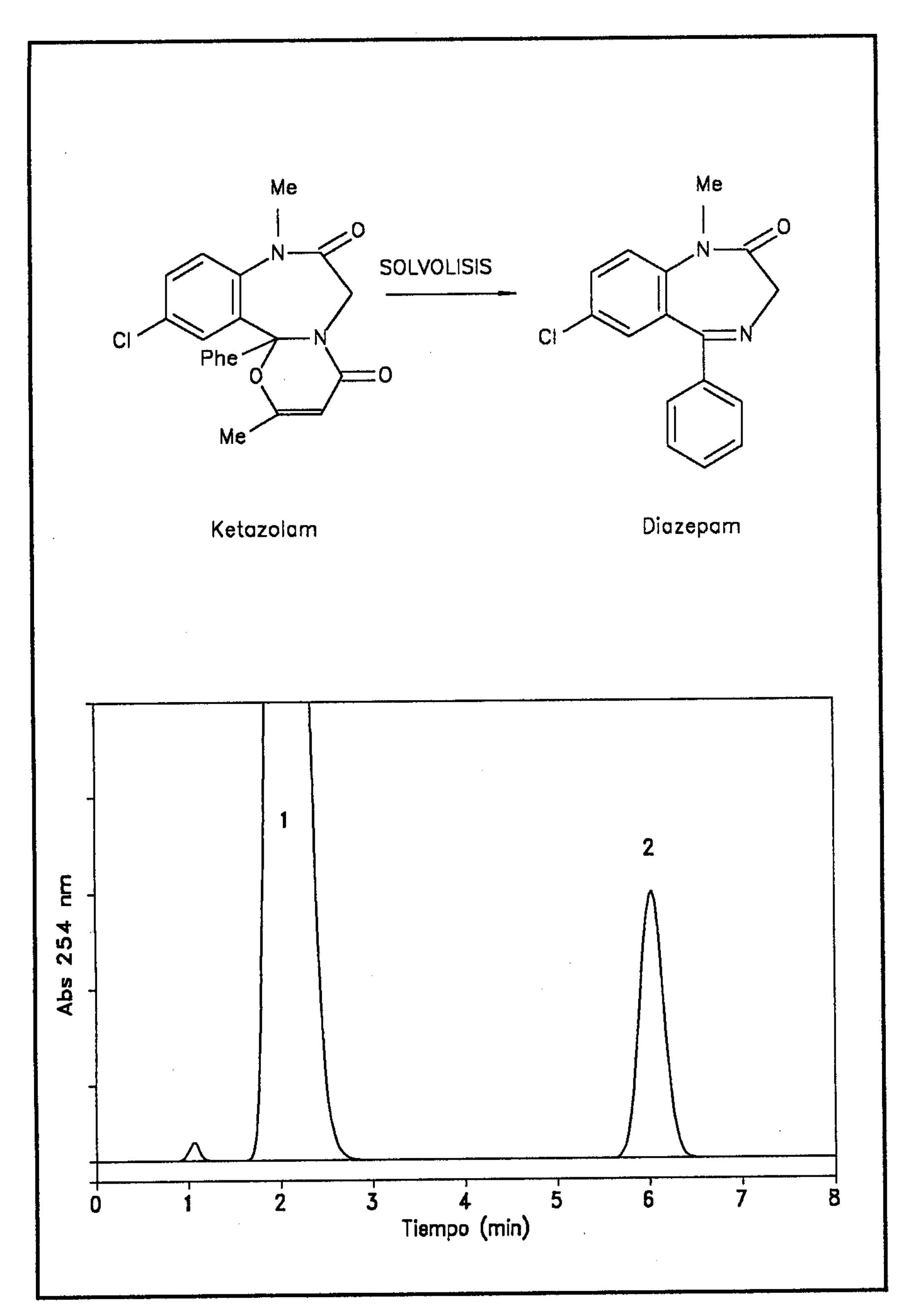


Fig. 10.4 Hidrólisis de Ketazolam a Diazepam y su determinación por HPLC

En cuanto al solvente de disolución de la muestra, en general, se prefiere que no induzca reacción ni descomposición del analito. Si ésto no es posible, en el método de análisis correspondiente se puede especificar el tiempo que el analito puede permanecer en contacto con el solvente de disolución. Esto último resulta una condición de suma importancia si se utilizan inyectores automáticos durante largos períodos de tiempo.

Errores asociados a la separación

Uno de los temas más importantes referidos a la cuantificación trata de los errores relacionados con deficiencias en la separación. Estas deficiencias pueden surgir del desarrollo de los métodos de análisis o de su aplicación rutinaria. De hecho, la aparición de problemas propios de la separación cromatográfica es muy frecuente y no todos los operadores están familiarizados con los mecanismos para resolverlos. Para minimizar estos errores se deben controlar los parámetros cromatográficos ya descritos anteriormente (sección 3.3), a saber: factor de capacidad (k'), tailing y resolución (R).
Recordemos que cuando el **factor de capacidad** (k') se iguala a cero, el analito eluye con el volumen muerto y no interactúa con la columna, es decir, la resolución se hace igual a cero. Por lo tanto resulta muy importante para un adecuado análisis cuantitativo que los picos a medir no se encuentren en el volumen muerto, ni en sus inmediaciones. Típicamente, se opera con valores de k' mayores a 2 para cromatogramas sencillos de hasta 5 o 6 picos, y mayores a 0.5 para cromatogramas complejos con muchos picos a resolver. Scott[14] ha estudiado la precisión en la integración de los picos en HPLC, obteniendo para un pico que eluye a k'= 0.22, valores de precisión tan pobres como RSD = 10.6 % (medición de área del pico utilizando un integrador digital), mientras que para otro pico de k'= 0.94, presente en la misma muestra, obtuvo valores de 1.55 %. Por ello, es necesario que el cromatografista que desarrolla los métodos de análisis tenga en cuenta esta situación, y ubique los picos en el cromatograma dentro del rango de valores de k' adecuado. Los mecanismos para regular el k' se describirán en la sección 11.2. .La retención relativa debe controlarse, además, durante el análisis rutinario de las muestras. Suele suceder que las columnas de fase ligada, con el uso, pierden sus grupos alquílicos por hidrólisis. Es decir que, en fase reversa, la retención de los solutos no polares suele disminuir con el transcurso del tiempo al deteriorarse la columna. La situación no es mucho mejor si se utiliza fase normal. En este caso la presencia de trazas de agua o de alcoholes polares (metanol, etanol) en los solventes reduce los tiempos de retención de manera muy importante.
El **tailing** (asimetría) es otro de los factores que contribuyen a los errores cromatográficos. Los integradores de uso habitual están diseñados para medir el área de picos simétricos y la presencia de asimetrías severas conduce, indudablemente, a pérdidas de precisión. Habitualmente, se pueden integrar sin mayores dificultades picos que presenten tailing hasta un valor de 2. Si durante el desarrollo de los métodos de análisis se presentan valores de tailing mayores, se debe sospechar la existencia de más de un

mecanismo de separación o la aparición de un segundo pico parcialmente solapado, y en ambos casos la metodología debe replantearse. En la sección 13.3 se describen algunas formas para resolver este problema. Por el contrario, si el tailing aparece durante el análisis rutinario de las muestras debe sospecharse algún tipo de deterioro de la columna. Finalmente, una **resolución** adecuada es fundamental para evitar errores en la cuantificación. Para que dos picos se integren adecuadamente, es necesario que estén separados por línea de base, es decir, la resolución entre ellos debe ser mayor que 1.5. El operador debe medir la resolución de los picos adyacentes **diariamente** para asegurar la correcta integración de los mismos. Por su parte el analista que desarrolla los métodos de análisis debe exigir valores de resolución mayores, preferentemente mayores que 2, de modo de asegurar separaciones aceptables a lo largo del tiempo, aún cambiando de lote de columna. Además, es necesario que ese valor de resolución se obtenga empleando, al menos, tres columnas diferentes de un mismo fabricante entre las cuales es conveniente incluir una columna nueva y una usada.

El Ensayo de Adecuación Cromatográfico de la USP XXII mencionado en la sección 10.4 incluye un método muy útil para evitar los errores cromatográficos durante el análisis de rutina. Este ensayo indica los valores requeridos para cada uno de los parámetros a medir que sirvan para definir la separación. Se especifica durante el desarrollo del método de análisis de manera tal que el operador que repite el método determine "a priori" si la separación obtenida es adecuada para la cuantificación. En este ensayo suele evaluarse además la eficiencia de la columna en reemplazo de la resolución, cuando se trata del análisis de impurezas que no están disponibles como estándares para la rutina y especifica la precisión mínima requerida en la inyección de estándares.

10.6 Detección

Los errores más comunes que surgen de la detección se refieren a la falta de estabilidad, sensibilidad o linealidad. Estos problemas son poco frecuentes con los detectores UV debido a la simplicidad de la detección ultravioleta y al desarrollo que los mismos han experimentado en los últimos años. A pesar de ello, estos factores deben estudiarse adecuadamente, especialmente si se desean analizar trazas. La **linealidad**, o rango lineal, es una condición imprescindible en todo método cuantitativo en el cual se calcula la concentración de analito en la muestra comparándola con un sólo estándar (sección 12.3). En general la falta de linealidad se soluciona reduciendo la masa de soluto inyectado. Sin embargo, es posible operar con sistemas no lineales siempre y cuando se utilice una curva de calibración como referencia cada vez que se realice el análisis.

En la selección de las condiciones óptimas para la cuantificación en HPLC utilizando un detector UV deben considerarse la longitud de onda de trabajo, el ancho de banda instrumental y la constante de tiempo del detector. Para una mejor sensibilidad la longitud

de onda de trabajo debe ubicarse en las proximidades del máximo de absorción de los picos de interés. Cuando los máximos de las sustancias de interés están muy alejados es posible trabajar a longitud de onda intermedia sin demasiado detrimento en la linealidad del sistema. La influencia del ancho de banda instrumental y la constante de tiempo del detector en la respuesta de los detectores UV han sido reportadas en la literatura[15,16].

10.7 Integración de la señal

La señal generada por el detector se transmite a los registradores o integradores. Los primeros grafican el pico y su área debe medirse manualmente, mientras que los segundos transforman la señal analógica en digital, calculan el área o altura de los picos y efectúan una serie de operaciones programadas generando finalmente un reporte analítico.

Integración manual

La descripción que haremos a continuación de los métodos de integración manuales será muy somera, debido a que actualmente los integradores han reemplazado en casi su totalidad a los registradores de pluma, en función de su bajo costo y sencillez de manejo. Entre los métodos de integración manual podemos mencionar la medición de la altura del pico, la triangulación, el producto de la altura por el ancho a media altura y el método del corte y pesada.

La **altura del pico**, medida como la distancia desde la línea de base al máximo del pico es, posiblemente, el método de integración más sencillo (figura 10.5). Se ha reportado que las cuantificaciones por altura de pico suelen dar resultados más exactos que por área[17], y en condiciones muy estables, puede dar también resultados más reproducibles[14]. Este hecho será discutido más adelante en este Capítulo.

La **triangulación** consiste en trazar las tangentes a los puntos de inflexión en ambos lados del pico, de manera tal de formar un triángulo con la línea de base (figura 10.5). El área del pico se obtiene multiplicando el valor de la base por la mitad de la altura. Si bien este método es el que mejor se aproxima al valor real del área en la muestra[18] es poco reproducible, debido a las imprecisiones que resultan de la medición del ancho del pico, y muy dependiente de la pericia del operador.

El producto de la **altura por el ancho a media altura** es uno de los métodos más utilizados para medir el área manualmente. El área que se obtiene por este método no resulta una medida tan exacta del área real como la que ofrece la triangulación pero es un método bastante preciso y sencillo para operar.

El método del **corte y pesada** es, posiblemente, el más complejo y laborioso. Con él puede obtenerse el área real del pico y es el único método que ofrece resultados exactos cuando los picos presentan cierto grado de asimetría. Su precisión depende de la

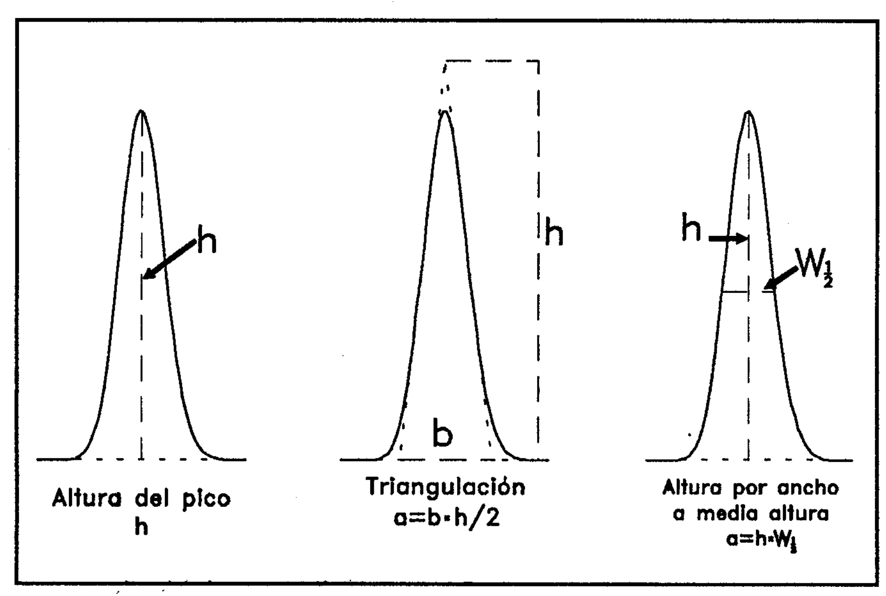


Fig. 10.5 Métodos manuales de integración: altura de pico, triangulación y altura por ancho a media altura.

homogeneidad del papel y, en gran medida, de la habilidad del operador.
Todos estos métodos requieren el trazado de la línea de base, y su precisión depende tanto de la concentración de analito en la muestra como de la atenuación del registrador. Para obtener resultados cuantitativos es necesario que la deriva de la línea de base sea mínima, y que la altura de los picos a medir esté entre un 50 y 100 % del ancho del papel. Por otro lado los picos con tailing habitualmente causan problemas de integración con casi todos ellos. Para integrar picos asimétricos puede recurrirse a alguno de los procedimientos citados en la literatura[19].

Integración automática

La integración automática se realiza actualmente con el uso de los modernos integradores electrónicos o con computadoras, aunque existen otros dispositivos como los planímetros y los integradores de disco.
Los **planímetros** son dispositivos que dan el área de los picos luego de seguir el contorno de los mismos. Su utilización es bastante compleja y debe medirse el área varias veces para obtener buenos resultados, pero son particularmente útiles para picos muy anchos o con asimetría.
Los **integradores de disco** son dispositivos que se acoplan al registrador y trabajan transformando la señal que corresponde al pico cromatográfico en una serie de trazos que

puede relacionarse con el área de los picos. Los integradores de disco eran las mejores opciones para medir el área de los picos antes del advenimiento de los integradores digitales, pero actualmente han caído en desuso.

Los **integradores digitales** procesan la señal proveniente de los detectores de manera tal de obtener tanto el dibujo del cromatograma como las áreas de los picos. Básicamente existen dos tipos de integradores digitales. En el primero, la señal del detector se procesa, según condiciones predefinidas, para obtener los resultados basados en la medida de áreas, alturas de pico y tiempos de retención. En el segundo, se almacena directamente la señal proveniente del detector, y esta señal se procesa con posterioridad.

De los dos tipos de integradores digitales el segundo es el que ofrece mejores posibilidades debido a que almacena los resultados "crudos" (sin procesar) de manera tal de que es posible reconstruir el cromatograma cambiando las condiciones de integración sin necesidad de volver a inyectar la muestra con lo cual se ahorra solvente y tiempo. La utilización de este tipo de integradores resulta fundamental cuando la cantidad de muestra con la que se cuenta para efectuar la inyección es escasa. En el primero, en cambio, los datos "crudos" se procesan durante la corrida y se descartan para almacenar el área, por ello el reprocesamiento no es posible.

De acuerdo a lo expresado por Ouchi[20], la manipulación de los resultados cromatográficos tiene lugar en cinco etapas diferentes, a saber:

- Adquisición de los datos
- Análisis de los datos
- Visualización de los datos
- Reporte de los resultados
- Manipulación de los datos

En la primer etapa, **adquisición de los datos**, el integrador recibe una señal continua (analógica) proveniente del detector y la transforma en discontinua (digital) en un convertidor analógico/digital (A/D). El convertidor A/D genera los puntos de señal que construirán el cromatograma y los almacena. La descripción de los tipos de convertidores A/D, sus modos de operación y de transferencia de los datos se encuentra detallada en la literatura[22].

En la segunda etapa, denominada **análisis de los datos**, esos puntos de señal que emergen del convertidor A/D se agrupan en intervalos y se determina el valor de la pendiente. Cuando la pendiente, medida después de cada intervalo, supera cierto valor de umbral prefijado (figura 10.6) el integrador detecta el comienzo del pico.

Habitualmente, para evitar la integración de ruidos en la línea de base como picos, el comienzo del pico se detecta cuando la pendiente supera al valor de umbral en varios intervalos consecutivos, por ejemplo 10 intervalos. El máximo del pico se establece cuando el signo de la pendiente pasa de positivo a negativo (es decir cuando la derivada primera se iguala a cero). Finalmente cuando la pendiente es inferior al valor absoluto del umbral en varios intervalos consecutivos se detecta la finalización del pico. Al detectar tanto el inicio como el final del pico los integradores suelen trazar marcas que indican en

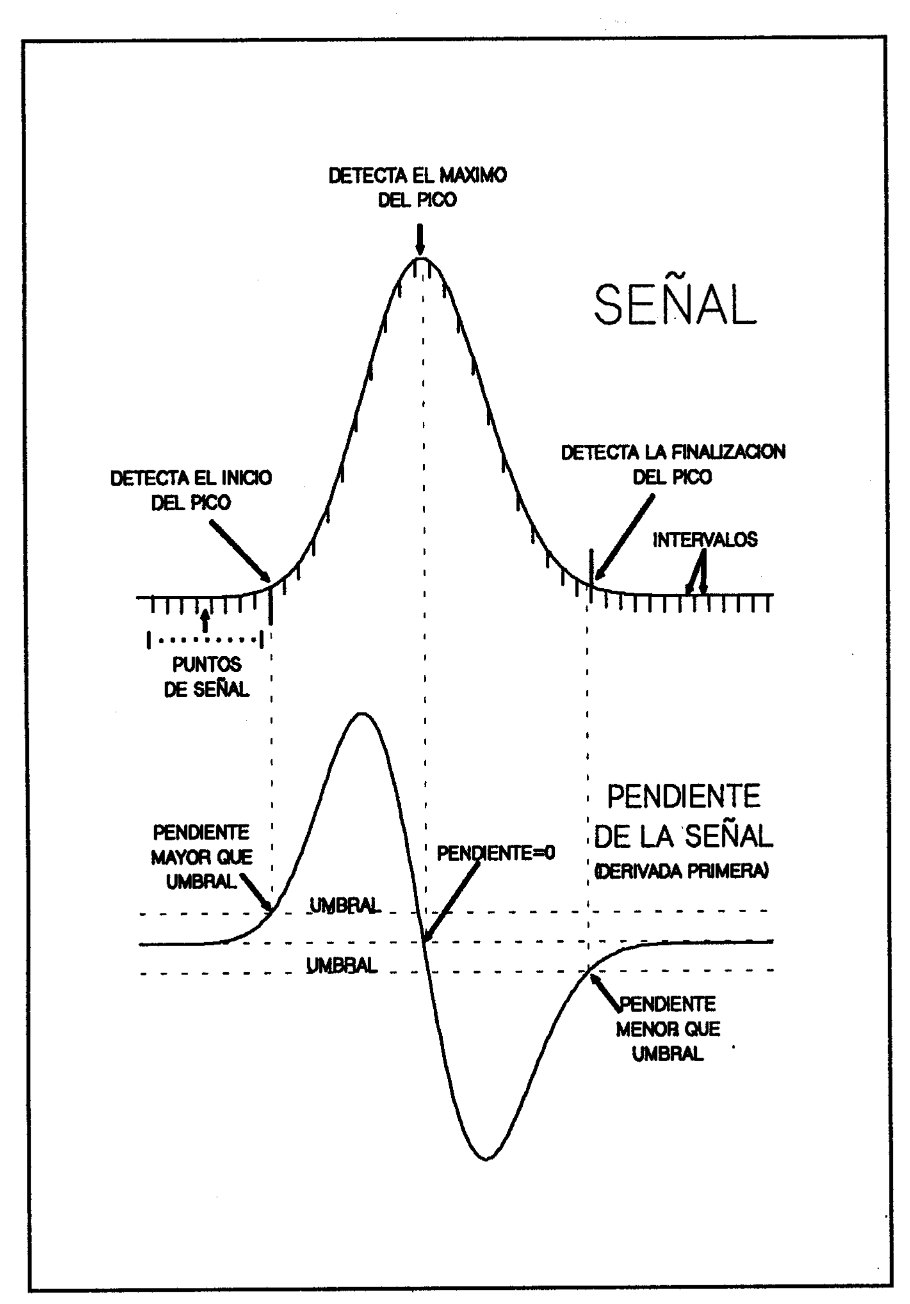


Fig. 10.6 Integración utilizando integradores digitales. La figura superior ilustra la señal cromatográfica, y la inferior su derivada primera (pendiente). Para más detalles ver texto.

qué momento se comienza y en qué momento se termina la integración. Desde la posición de las marcas, dependiendo del tipo de integrador, se toman algunos intervalos antes del inicio y después de la terminación y su área se agrega a la del pico en cuestión. El tiempo de retención se determina en el máximo del pico y se suele imprimir en sus proximidades. Para obtener resultados cuantitativos es necesario ingresar las condiciones de integración adecuadas. Para ello se deben definir dos parámetros: el valor de umbral (o pendiente) y el valor del ancho del pico. El valor del ancho del pico se refiere a la cantidad de puntos de señal que conforman un intervalo y suele medirse como el valor del ancho del pico en unidades de tiempo, determinado a media altura o en su base. Este valor puede mantenerse constante o variarse dentro de un mismo cromatograma de manera tal de integrar apropiadamente picos angostos y anchos en una misma corrida.

El umbral (también denominado pendiente según la marca de integrador) se refiere, como dijimos anteriormente, a la señal mínima que se considera como pico y suele medirse como cambios de señal en períodos de tiempo dados, por ejemplo: microvoltios/segundo. Para determinarlo se equilibra adecuadamente el solvente de corrida, se registran las fluctuaciones de la línea de base por algunos segundos y se coloca un valor de umbral que desconozca esas fluctuaciones.

Picos anchos requieren intervalos grandes (anchos de pico grandes), mientras que picos angostos requieren intervalos pequeños (anchos de pico pequeños).

Cuando los picos no están bien resueltos o aparecen sobre líneas de base con deriva, es posible realizar correcciones para medir su área (corrección valle a valle, trazado de la línea de base horizontal, trazado de la línea de base sobre picos con tailing, etc). Los tipos más comunes de picos cromatográficos se ejemplifican en la figura 10.7. Algunos integradores trazan la línea de base utilizada para que el cromatografista visualice la corrección empleada y otros colocan un código de identificación indicativo del tipo de línea de base usada.

En la tercer etapa, **visualización de los datos**, los puntos de señal que se han digitalizado deben transformarse en analógicos para generar el gráfico X-Y que se denomina cromatograma. Este punto, probablemente, es uno de los que más han avanzado en los últimos años comenzando con los graficadores de papel hasta las modernas computadoras con softwares avanzados que permiten visualizar el cromatograma en una pantalla, procesarlo, e inclusive pueden amplificar las zonas de mayor interés.

En la cuarta etapa, **reporte de los resultados**, se realizan los cálculos de la concentración del analito con alguna de las calibraciones habituales en cromatografía que detallaremos en la sección 10.8. Asimismo, pueden imprimirse otros datos adicionales como los nombres de los compuestos a analizar, la fecha, o el nombre del operador. Algunos integradores son programables, pueden almacenar las condiciones de trabajo para cada tipo de corrida y generar reportes diseñados por el mismo usuario.

Finalmente, la quinta etapa comprende la **manipulación de los datos** con la ayuda de sistemas de computación. Esta etapa se efectúa, habitualmente, conectando el integrador a una computadora central que permita procesar los datos al mismo tiempo que permite almacenar los resultados.

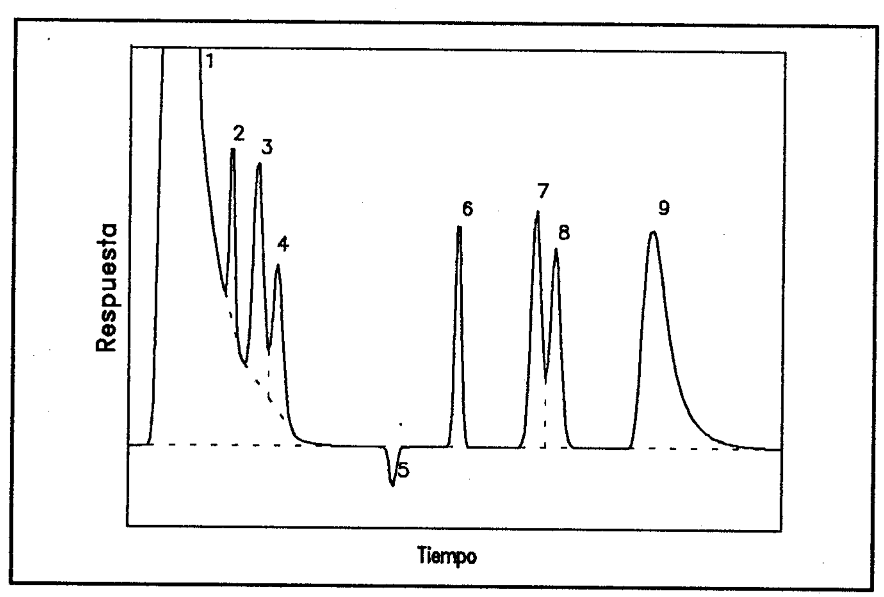


Fig. 10.7 Tipos más comunes de picos en HPLC.1) Pico del solvente.2) Pico montado sobre la cola de otro pico.3 y 4) Picos fundidos montados sobre la cola de otro pico.5) Pico negativo.6) Pico aislado bien resuelto.7 y 8) Picos fundidos.9) Pico asimétrico.

También es posible emplear una computadora personal capaz de realizar las cinco etapas en un sólo instrumento. En este caso es necesario intercalar un convertidor A/D o interfase entre el detector y la computadora. De esta manera, la señal, generalmente analógica, generada por el primero se digitaliza para que la PC pueda interpretarla. Estas interfases permiten el acoplamiento de varios detectores en una misma PC, y procesan las señales de varios cromatógrafos. También se suele incluir un buffer (en su acepción informática) que permita almacenar la información recibida hasta un momento determinado de manera tal de "liberar" a la PC para otras aplicaciones.

Errores asociados a la integración

Los errores más comunes en la integración manual se refieren al trazado y medición de la línea de base, en general cuando existen picos parcialmente solapados o derivas. Los errores típicos asociados a la integración se detallan en la tabla 10.I.
En los integradores digitales, a pesar de su simplicidad de manejo, muchas veces existen errores en la integración de los picos, debidos generalmente a la mala definición de las condiciones de trabajo. Valores de ancho de pico inadecuados conducen a defectos o excesos en la cantidad de intervalos con los que se integra un pico. Valores de pendiente (o umbral) muy bajos conducen a la integración de ruidos en la línea de base, mientras

METODO	PRECISION RSD
Altura del pico	1 - 2 %
Triangulación	3 - 4 %
Altura x ancho a media altura	2 - 3 %
Corte y pesada	2 - 3 %
Planímetro	3 - 4 %
Integradores de disco	0.5 - 1 %
Integradores digitales	0.1 - 0.2 %

Tabla 10.I Errores asociados a los diferentes modos de integración.

que con valores de pendiente (o umbral) demasiado elevados se puede eliminar parte del pico en la integración. Para reconocer si las condiciones de integración son las apropiadas se suelen visualizar la posición de las marcas de integración y el tiempo de retención de los picos. En este punto no existen reglas generales y debe consultarse el manual de cada integrador en particular.
Si los picos están convenientemente separados ($R \geq 1.5$), no existen derivas ni picos negativos, los errores generados por la indefinición de la línea de base son prácticamente imponderables, aunque en algunos casos, una mala integración puede llevar a errores muy manifiestos (figura 10.8). Asimismo, como ya hemos discutido en la sección 10.6 los picos con tailing severo (≥ 2.0) suelen ofrecer dificultades para la integración.

Medición de área o altura del pico

La cuantificación de los picos cromatográficos puede realizarse midiendo su área o altura. La mayor parte de los cromatografistas acostumbra a medir el área, aunque se ha reportado una mejor precisión midiendo la altura en lugar del área[14] siempre y cuando los picos sean simétricos y las condiciones de operación se mantengan constantes.
Como la concentración de un analito es directamente proporcional al área que genera, cualquier factor que modifique el valor del ancho del pico influirá sobre la cuantificación por altura. A eficiencia constante, un aumento en los tiempos de retención va acompañado de un aumento en el valor del ancho del pico (ecuación 3-14), y consecuentemente, de una disminución de la altura. Asimismo, cualquier parámetro que modifique la eficiencia de la columna modificará al valor del ancho del pico. Las condiciones experimentales que conducen a estas modificaciones se detallan en la tabla 10.II. Por estos motivos Pauls y Mc Coy[21] en un estudio interlaboratorio donde las condiciones no eran tan estrictamente

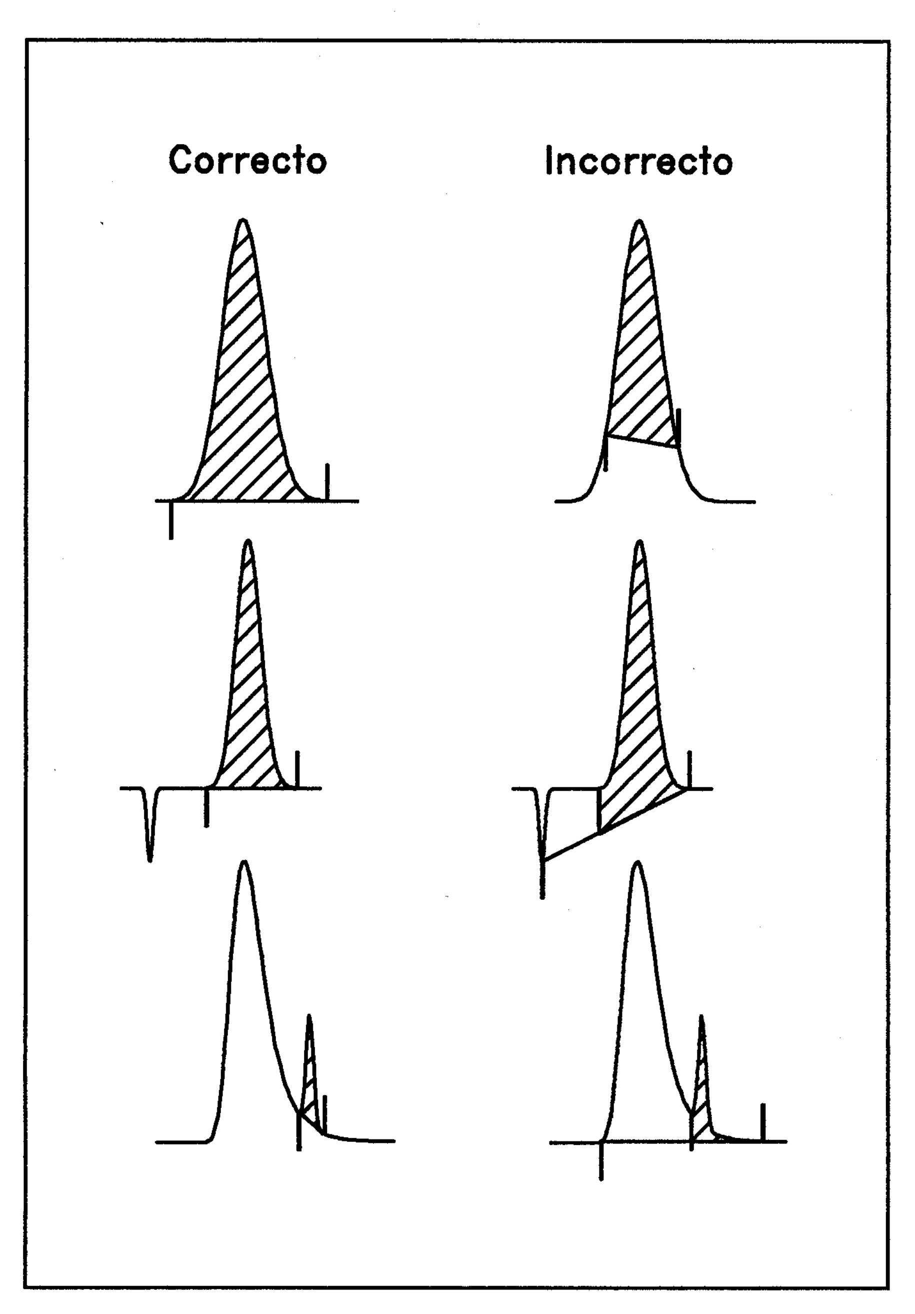


fig. 10.8 Errores de integración más frecuentes originados por deficiencias en el trazado de la línea de base.

VARIABLE	Se modifican			
	k'	w	h	A
Composición del solvente	si	si	si	no
Temperatura	si	si	si	no
Compresión en la cabeza de la columna	no	si	si	no
Contaminación en la cabeza de la columna	no	si	si	no

Tabla 10.II Factores que influyen en la cuantificación de los picos. k' es la retención relativa, w el ancho del pico, h la altura y A el área.

controladas como en las indicadas por Scott[14], hallaron mejores precisiones por área que por altura de pico. Por otro lado, Kikta y Stange[23] reportaron un 6 % de variación en los resultados por altura de pico cuando la temperatura del laboratorio fluctuaba desde 20° por la mañana hasta 32°C a mediodía.

En contrapartida, las mediciones de área resultan poco precisas cuando no se puede definir exactamente la línea de base. Así, resulta más conveniente medir altura en el caso de picos parcialmente resueltos, de picos con tailing muy severo (que no puede corregirse cromatográficamente), y en el análisis de trazas si la línea de base es muy ruidosa.

10.8 Cálculo de la Concentración de analito

La concentración de analito en la muestra se puede calcular por diferentes métodos, a saber:

- Normalización interna (Estandarización interna)
- Estándar externo
- Estándar interno
- Estándar agregado

La selección del método más adecuado depende del tipo de muestra, del nivel de precisión requerido y de la existencia o no de sustancias de referencia. Un ejemplo de aplicación de cada uno de estos métodos se detalla en la figura 10.9.

Estándar

Picos	Concentración	Area 1	Area 2	Area 3	Promed.	RSD
1	20.5 g/100ml	10556	10608	10577	10580	0.2 %
2	11.0 g/100ml	5357	5384	5368	5370	0.3 %
3	40.5 g/100ml	21801	21910	21844	21852	0.3 %

Muestra

Picos	Area 1	Area 2	Area 3	Promedio	RSD
1	10446	10509	10477	10477	0.3 %
2	5277	5309	5293	5293	0.3 %
3	23961	24105	24032	24033	0.3 %
ΣA	39684	39923	39802	39803	0.3 %

Normalización interna

$$\%\,1 = \frac{10477 \times 100}{39803} = 26.3\,\%$$

$$\%\,2 = \frac{5293 \times 100}{39803} = 13.3\,\%$$

$$\%\,3 = \frac{24033 \times 100}{39803} = 60.4\,\%$$

Estándar Externo

$$C_1 = \frac{10477 \times 20.5}{10580} = 20.3 \text{ g/100 ml}$$

$$C_2 = \frac{5293 \times 11.0}{5370} = 10.8 \text{ g/100 ml}$$

$$C_3 = \frac{24033 \times 40.5}{21852} = 44.5 \text{ g/100 ml}$$

sigue ➔

Estándar Interno (Tomando el pico 2 como estándar interno)

$$C_1 = \frac{1.979 \times 20.5}{1.970} = 20.6 \text{ g/100 ml}$$

$$C2 = \frac{0.4.540 \times 11.0}{4.069} = 45.2 \text{ g/100 ml}$$

Fig. 10.9 Métodos de Cuantificación. Normalización interna, estándar externo y estándar interno. Ejemplo de aplicación.

Normalización Interna

El método de la Normalización Interna, llamado también Estandarización Interna, consiste en referir el contenido de analito al total de áreas en el cromatograma. Para ello se suman las áreas de todos los picos presentes (exceptuando al pico que corresponda al solvente) y el contenido de analito en la muestra se calcula según:

$$P_i = \frac{A_i}{\Sigma A_i} 100 \qquad \textbf{(10-1)}$$

Donde P_i es el porcentaje del componente i en la mezcla, A_i es el área del componente i, y ΣA_i es la sumatoria de todas las áreas del cromatograma.

Este método tiene, fundamentalmente, dos ventajas: no requiere estándar de referencia y es muy preciso ya que los errores de inyección y de preparación de la muestra se compensan. En contrapartida tiene varias limitaciones: en primer lugar, para obtener resultados medianamente exactos es necesario que todos los componentes de la mezcla se separen en el sistema cromatográfico elegido, lo cual no siempre ocurre. Y en segundo lugar se requiere que todos los componentes tengan el mismo factor de respuesta (f_i). Es decir, que si se trabaja con un detector UV, todas las sustancias deben tener el mismo valor de absortividad a la longitud de onda elegida. Este caso suele darse pocas veces y habitualmente con familias de compuestos o sustancias que están muy relacionadas. Por este motivo, a pesar de sus ventajas y de su amplia difusión en GC con el detector de llama, este método prácticamente no se utiliza en HPLC.

Si se cuenta con los componentes puros, el método puede corregirse calculando sus factores de respuesta, es decir:

$$P_i = \frac{f_i A_i}{\Sigma f_i A_i} 100 \qquad \textbf{(10-2)}$$

Donde f_i es el factor de respuesta calculado por la inyección de cada uno de los componentes según:

$$f_i = \frac{P_i}{A_i} \qquad (10\text{-}3)$$

Si el detector que se utiliza es el UV, y no se dispone de los patrones aislados de los componentes de la mezcla, queda la posibilidad de hallar los valores correspondientes a sus absortividades en la bibliografía y emplear esos valores para construir las tablas de la calibración. Sin embargo, es evidente que cualquier aproximación que se realice en este aspecto irá en detrimento de la exactitud del resultado del análisis.

Estándar Externo

El Estándar Externo es, sin lugar a dudas, el método de cuantificación más utilizado en HPLC. Consiste en la preparación de estándadares de concentración semejante al analito en la muestra y en el ensayo cromatográfico de ambas, muestra y estándar, en las mismas condiciones operativas. La concentración de analito en la mezcla se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia. Es decir:

$$P = \frac{A_m C_s}{A_s} \, D \; 100 \qquad (10\text{-}4)$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, A_m y A_s son las áreas de la muestra y el estándar respectivamente, C_S es la concentración del estándar y D es un factor de dilución.

Este método requiere, obviamente, la utilización de un estándar de referencia y su exactitud dependerá ampliamente de la calidad del estándar utilizado. La precisión de los datos que se obtienen depende tanto de la preparación de la muestra y el estándar como de la inyección de ambos, ya que utilizando esta modalidad de trabajo, ninguna de las dos operaciones se compensa. De hecho, la precisión de esta metodología es muy sensible a los errores de inyección. Por ello, para mejorarla se suelen realizar varias inyecciones, típicamente 3 inyecciones de estándar y dos inyecciones de cada muestra. Además, para evitar la falta de precisión originada en las variaciones ambientales se pueden correr alternativamente muestra y estándar[22] o intercalar estándares después de un grupo de unas 5 ó 6 muestras.

La concentración de analito en la muestra puede obtenerse matemáticamente utilizando la ecuación 10-4, o bien gráficamente utilizando para ello una curva de calibración. En el primer caso para obtener resultados cuantitativos válidos es necesario que el método sea lineal y proporcional. Este tema se discutirá en la sección 12.3.

Estándar Interno

El método del Estándar Interno consiste en agregar cantidades exactamente medidas de una sustancia así denominada, tanto a la muestra como a un estándar que contiene al analito, preparado con la misma concentración que la muestra.
Para determinar la concentración de analito en la muestra se calcula la relación de áreas de analito a estándar interno tanto en la muestra y como en el estándar y se efectúa el cociente entre ambas. Es decir:

$$P = \frac{R_m C_s}{R_s} D \; 100 \qquad (10\text{-}5)$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, R_m y R_s son las relaciones de área de analito a estándar interno en la muestra y el estándar respectivamente, C_S es la concentración del estándar y D es un factor de dilución.
Este método requiere de patrones de referencia, al igual que el método del Estándar Externo, por lo cual su exactitud dependerá de la pureza de los mismos. Además requiere del uso de otra sustancia, el estándar interno, cuya pureza no tiene que ser tan controlada como la del patrón de referencia, pero debe cumplir con los siguientes requisitos:

- No debe estar presente en la muestra
- Debe presentar un área similar al analito
- Debe eluir a un valor de k' cercano al analito
- Debe resolverse completamente ($R \geq 1.5$)
- Debe ser estable y químicamente inerte
- Debe responder en forma semejante al analito con el detector seleccionado

El método del Estándar Interno no es sensible a los errores de inyección debido a que estos errores se compensan al utilizar relaciones de áreas, y, en algunos casos, pueden compensarse los errores generados en la preparación de la muestra como ser dilución, extracción y derivatización.
La utilidad del estándar interno para compensar los errores de dilución es innegable, aunque en el caso de la derivatización y extracción, los resultados deben manejarse con cuidado porque es posible empeorar los resultados en lugar de mejorarlos[24].
El uso de estándar interno para compensar los errores de inyección es prácticamente obligado en GC porque el error de inyección es grande, pero tiene menor sentido en HPLC donde éstos son mucho menores. Las opiniones respecto de las utilidad del estándar interno son bastante dispares. Muchos autores[25,26] recomiendan su uso para obtener precisiones analíticas aceptables mientras que otros[17,27] pregonan que su utilización no es necesaria. Por ello es aconsejable evaluar la utilidad del estándar interno en cada caso en particular.
Snyder y Kirkland[17] han reportado que utilizando un estándar interno la precisión del

sistema cromatográfico puede empeorar en $\sqrt{2} = 1.4$ veces debido a la incertidumbre generada por la medición de dos picos en lugar de uno. Haefelfinger[27] estudió varias cuantificaciones utilizando estándar interno y demostró que, si los errores de inyección eran pequeños, de acuerdo a la teoría de propagación de los errores, la precisión de la medida en lugar de mejorar podía empeorar.

Por otro lado, se debe considerar que se agrega un pico más al cromatograma, por lo cual la separación se hace más compleja. De todas maneras, si se desea utilizar un estándar interno solamente para compensar los errores de inyección no es necesario aislar o adquirir sustancias semejantes al analito. Se puede recurrir a la serie de alquilfenonas reportadas por Kikta y Stange[23]. Estas sustancias son compuestos neutros y su retención no se ve afectada por buffers o reactivos de apareamiento iónico por lo cual son especialmente útiles como estándares internos en fase reversa en cualquier fase móvil que se utilice. Sin embargo, los autores recomiendan no utilizarlos con muestras que contengan aminas primarias pues pueden reaccionar químicamente.

Para calcular la concentración de analito puede utilizarse la ecuación 10-5 o bien una curva de calibración. Para que el primer caso sea válido es necesario demostrar que la relación de áreas de analito a estándar interno es lineal y proporcional respecto de la concentración de analito (sección 12.3).

Estándar Agregado

El método del Estándar Agregado consiste en inyectar dos muestras para realizar un análisis, una de ellas es la muestra tal cual y la otra es la muestra a la que se le agrega una cantidad conocida de estándar de referencia. Esta segunda muestra se utiliza como estándar. La concentración del analito en la muestra se calcula de la siguiente manera:

$$P = \frac{A_m C_s}{A_{ms} - A_m} D \; 100 \qquad (10\text{-}6)$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, A_m y A_{ms} son las áreas del analito en la muestra tal cual y la muestra a la que se le ha agregado estándar respectivamente, C_S es la concentración del estándar y D es un factor de dilución.

Este método, como el del Estándar Externo, tiene principalmente dos desventajas: requiere el uso de un estándar de referencia y es sensible a los errores de inyección y preparación de la muestra. A pesar de que es mucho menos utilizado resulta el método de elección cuando la matriz de la muestra es muy compleja y lleva a cambios o deformaciones en los picos. En estos casos suele también agregarse la matriz de la muestra al estándar como alternativa al método del Estándar Agregado..

Con este método se puede, al igual que con los anteriores, efectuar directamente los cálculos o trabajar con una curva de calibración. La diferencia respecto de los otros métodos es que en este caso la curva de calibración no es proporcional, es decir no pasa

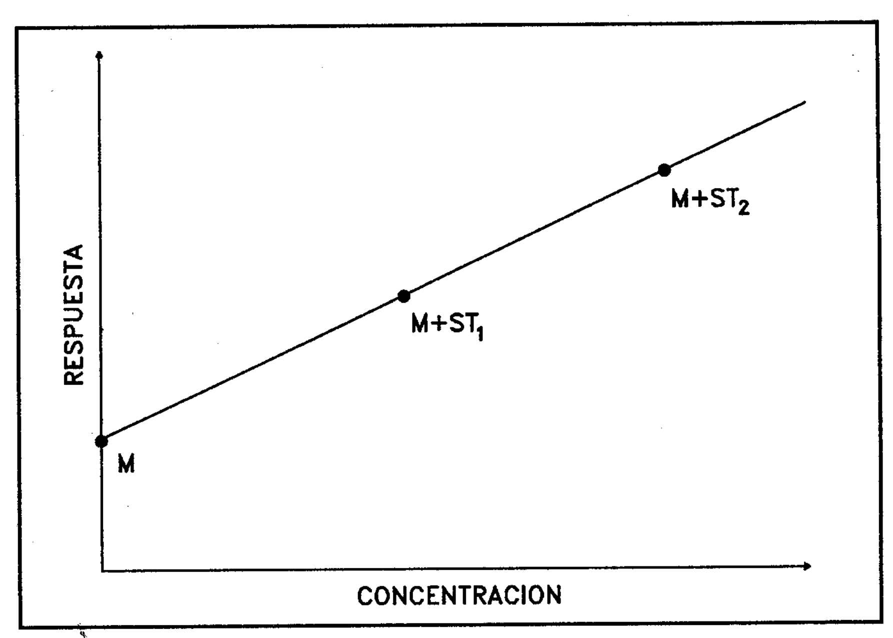


fig. 10.10 Curva de calibración utilizando el método del agregado de estándar.

por el origen, y la ordenada al origen corresponde a la concentración de analito en la muestra (figura 10.10).

Referencias

1. ACS-SEAC, Anal Chem 52, 2242 (1980)
2. Kratochvil B.,Wallace D., Taylor J.K. Anal Chem 56 113R (1984)
3. Koltoff M., Sandell E. B. "Análisis Químico Cuantitativo", Ed Nigar, 4º edición. Buenos Aires (1972)
4. Colin H., Martin M., Guiochon G., J Chrom 185, 79 (1979)
5. Dolan J.W., Snyder L.R."Troubleshooting LC Systems". Humana Press. Clifton NY (1989)
6. Operating Instructions for Model 7215, Rheodyne, Berkeley
7. Technical Notes 1. Rheodyne, Berkeley. Sept 1979
8. De Leenheer A.P., Nelis H.J.C.F., J Chrom 140, 293 (1977)
9. De Leenheer A.P., Nelis H.J.C.F., J Pharm Sci 68, 999 (1979)
10. De Leenheer A.P., Nelis H.J.C.F., J Pharm Sci 68, 1527 (1979)
11. Knox J.H., Jurand J., J Chrom 186, 763 (1979)
12. Branfman A.R., Mc Comish M., J Chrom 151, 87 (1978)
13. Reingold R., Picciano M.F., Perkins E.G., J Chrom 190, 237 (1980)
14. Scott R.P.W., Reese C.E., J Chrom 138, 283 (1977)
15. Stewart J.E., J Chrom 174, 283 (1979)
16. Higgins J.W., J Chrom 148, 335 (1978)
17. Snyder L.R., Kirkland J.J. "Introduction to Modern Liquid Chromatography". 2º Ed. J. Wiley. NY (1979)
18. Condal L., Bush M., J Chem Ed 41, A 235 (1964)
19. Jóver B., Juhász J., J Chrom 154, 226 (1978)
20. Ouchi G., LC-GC 9, 235 (1991)
21. Pauls R.E.,Mc Coy R.W,. J Chrom Sci 24, 273 (1986)
22. Scott R.P.W. "Liquid Chromatography Detectors". Elsevier Science Publishers. 2º Ed (1986)
23. Kikta E.J., Stange A.E,. J Chrom 138, 41 (1977)
24. Curry S.H., Whelpton R. "Blood Drugs and other Analytical Challenges". Ellis Horwood. Chichester (1978)
25. Leitch R.E., J Chrom Sci 9, 531 (1971)
26. Chandler C.D., Gibson G.R., Bolleter W.T., J Chrom 100, 185 (1975)
27. Haefelfinger P., J Chrom 218, 73 (1981)

Capítulo 11

Desarrollo de Métodos

11.1 Introducción

Al igual que en todo campo de la química analítica, el enfoque general en HPLC puede tener varias perspectivas según la meta perseguida. Así, en cromatografía preparativa, la meta será la obtención de la mayor cantidad posible de una fracción determinada, de alta pureza, en la cual sea sencilla la posterior eliminación de la fase móvil. El factor a optimizar será α y el parámetro más importante la capacidad de carga de la columna. No son tan importantes, en cambio, la eficiencia global (siempre que sea suficiente para la separación primaria), el tailing y en general la geometría del pico, factores trascendentales para el análisis cuantitativo. En el campo biológico o bioquímico, la cantidad de muestra de la que se dispone para el análisis suele ser escasa y la matriz demasiado compleja como para ser tratada en forma directa, constituida por compuestos de estructura muy diversa, en muchos casos interferencias potenciales, que en general no se consigue -ni interesa- cuantificar. En la industria farmacéutica o en síntesis orgánica, el factor limitante no es en general la disponibilidad de muestra, y los objetivos del análisis pueden ser la droga primaria, excipientes, productos de partida, subproductos de síntesis y productos de degradación.

Este capítulo se dirige al análisis cuantitativo, tratando de fijar pautas generales que podrán (y deberán, cuando sea necesario) ser modificadas y adaptadas al caso particular empleando herramientas fundamentales para todo analista: **lógica y sentido común.**

En muchos casos, el desarrollo de un método se encara desde un punto de vista empírico: se intenta la separación en fase reversa. Si ésta fracasa se prueba apareamiento iónico, se cambia la columna, el pH, etc, recurriendo a interminables ensayos de prueba-error. No es extraño encontrarse así con métodos en los cuales el k' es muy próximo a cero, el tailing pronunciado, los cromatogramas contienen amplios sectores vacíos separando bandas a veces parcialmente solapadas, etc, o bien pueden obtenerse cromatogramas aceptables, pero que no se acompañan de los ensayos finales de validación.

Dado que el desarrollo es costoso e insume mucho tiempo, es preferible emplear caminos sistemáticos, efectuando los ensayos en una dirección segura o al menos con buenas probabilidades de éxito, evitando ensayos innecesarios y documentando los resultados, no sólo para el desarrollo mismo sino para futuras revisiones.

Indudablemente, el primer paso debería consistir en una investigación bibliográfica. Sería lamentable invertir semanas de trabajo para llegar a conclusiones que podrían obtenerse en minutos de consulta en una base de datos adecuada, dirigidas al analito específico o a compuestos químicamente relacionados que puedan aportar información útil, fácilmente transferibles al problema en estudio.

La figura 11.1 muestra en un diagrama de flujo los pasos a seguir en un desarrollo sistemático de métodos en HPLC que, con algunas modificaciones, puede ser adaptado a otras metodologías.

En primer lugar, deberá fijarse con claridad cuál es la meta perseguida, y los límites de

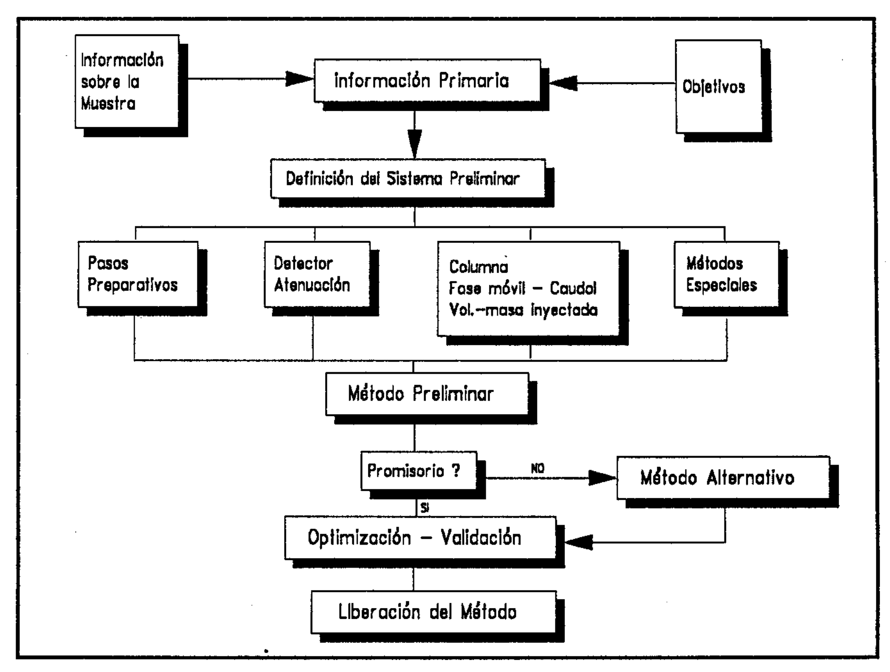


Fig. 11.1. Pasos en el desarrollo de métodos por HPLC.

dichos objetivos, por ejemplo

- ¿Se requiere identificación, screening o cuantificación?
- ¿Cuál es el nivel presente (macro o microcomponentes)?
- ¿Cuál es la precisión requerida?
- ¿Cuántos componentes se desean valorar?
- ¿Cuántas muestras se desea procesar?

Evidentemente, no será igual el hecho de informar que el análisis de orina de un atleta contiene o no restos o metabolitos de un anabólico, o que una bebida contiene un 90 o un 110 % del edulcorante declarado.
El número de componentes a valorar tiene que ver con el "espacio" útil en el cromatograma. Los métodos isocráticos son incapaces de dar cabida a más de 10-12 picos, por lo cual en casos más complejos se prefiere trabajar con gradiente de elución.
El número de muestras a evaluar puede no ser relevante para pocos ensayos, pero largas rutinas pueden indicar la necesidad de contar con equipos automáticos.
Con respecto a la muestra, es importante o conveniente conocer:

- Identidad de componentes de interés.
- Rango de pesos moleculares de los componentes de interés.
- Estructura química, pKa, solubilidad, espectros UV.

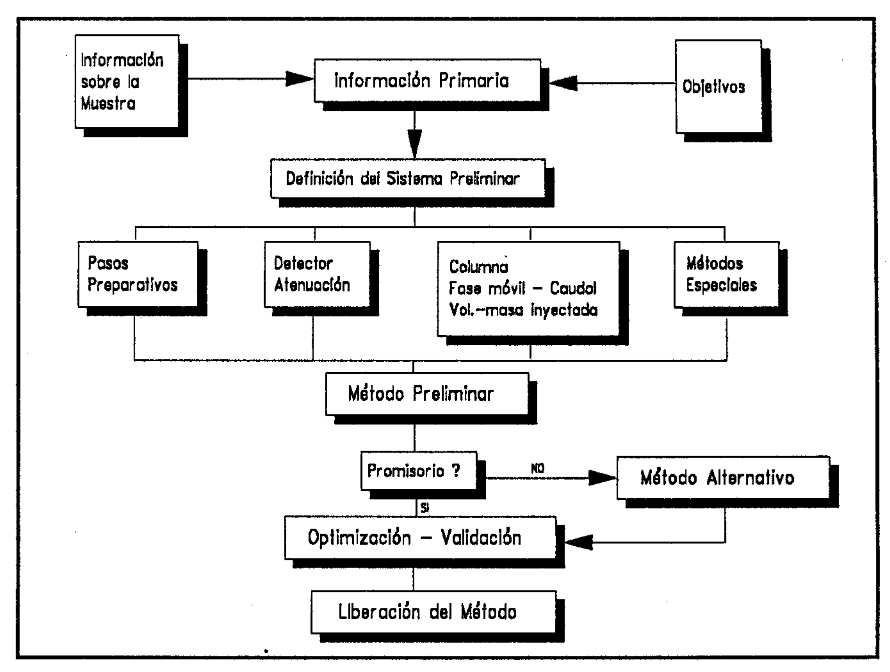


Fig. 11.1. Pasos en el desarrollo de métodos por HPLC.

dichos objetivos, por ejemplo

- ¿Se requiere identificación, screening o cuantificación?
- ¿Cuál es el nivel presente (macro o microcomponentes)?
- ¿Cuál es la precisión requerida?
- ¿Cuántos componentes se desean valorar?
- ¿Cuántas muestras se desea procesar?

Evidentemente, no será igual el hecho de informar que el análisis de orina de un atleta contiene o no restos o metabolitos de un anabólico, o que una bebida contiene un 90 o un 110 % del edulcorante declarado.

El número de componentes a valorar tiene que ver con el "espacio" útil en el cromatograma. Los métodos isocráticos son incapaces de dar cabida a más de 10-12 picos, por lo cual en casos más complejos se prefiere trabajar con gradiente de elución.

El número de muestras a evaluar puede no ser relevante para pocos ensayos, pero largas rutinas pueden indicar la necesidad de contar con equipos automáticos.

Con respecto a la muestra, es importante o conveniente conocer:

- Identidad de componentes de interés.
- Rango de pesos moleculares de los componentes de interés.
- Estructura química, pKa, solubilidad, espectros UV.

- Concentración de los componentes de interés.
- Naturaleza de la matriz (suero, orina, tabletas, etc.)

Una vez completada esta información, podrá definirse un sistema preliminar.

Definición del Sistema Preliminar

El primer punto a evaluar durante la definición del sistema preliminar consiste en determinar qué pasos preparativos pueden necesitarse para mantener el analito en solución, en la concentración adecuada. En muchos casos la preparación puede ser tan simple como la extracción líquido-líquido o líquido-sólido y en otros, pueden necesitarse varios pasos de preconcentración previos (para mayores detalles, véase capítulo 9, "Preparación de Muestras").

El segundo punto a considerar es el detector a utilizar. El detector de primera elección y el más empleado es el UV, por su simplicidad de uso, robustez y confiabilidad. Cuando no es posible su empleo porque el analito carece de grupos cromóforos o porque su respuesta es baja, es posible emplear otros detectores (índice de refracción, fluorescencia, o electroquímicos), o bien emplear métodos de derivatización.

Así por ejemplo, los ácidos grasos no saturados no presentan respuesta al UV pero pueden ser detectados y cuantificados fácilmente por índice de refracción, aunque si la concentración es muy baja deberá recurrirse, por ejemplo, a la derivatización precolumna con bromuro de fenacilo, para obtener un compuesto con un máximo de absorción a 260 nm, con límites de detección del orden de los nanomoles[1-4].

Finalmente se decide cuál es el método de elección para la separación. Las figuras 11.2 y 11.3 muestran los caminos de preferencia según la naturaleza de la muestra. En ellas puede verse que son muy diferentes según el tamaño molecular del analito.

Análisis de compuestos de peso molecular mayor de 2000

Los compuestos de peso molecular mayor de 1000 o 2000 Daltons necesitan un enfoque diferente:

La primer alternativa es la cromatografía de exclusión por tamaño molecular (SEC), clasificada en GFC (gel filtration chromatography) y GPC (gel permeation chromatography) sólo en forma descriptiva del medio empleado, hidrófilo o hidrófobo.

Sin embargo deben considerarse también otras alternativas, algunas con fuerte base experimental y otras en pleno desarrollo:

Cromatografía de Intercambio Iónico[5], empleada para la separación de péptidos, proteínas, polinucleótidos y ácidos nucleicos. Los sistemas emplean intercambiadores débiles (WAX y WCX) y fuertes (SAX y SCX) sobre base sílica o polimérica, y fases móviles acuosas en las cuales se varía pH y fuerza iónica.

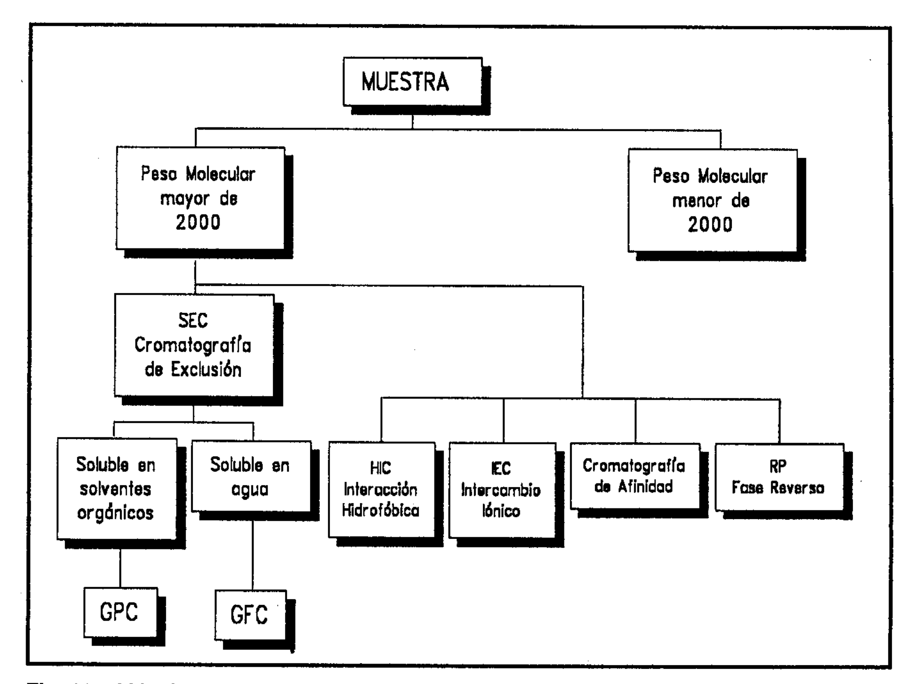


Fig. 11.2. Métodos cromatográficos de primer elección y alternativos para componentes de peso molecular mayor de 2000 Daltons.

Cromatografía de afinidad[6,7], en la cual se emplean compuestos biológicamente activos inmovilizados en la fase estacionaria. Estos compuestos se llaman ligandos de afinidad (anticuerpos, hormonas, etc) y son reconocidos por el analito (por un mecanismo antígeno-anticuerpo, receptor-hormona, etc) que se fija reversiblemente y bioselectivamente a la molécula complementaria por el mecanismo "llave-cerradura" tan conocido en la naturaleza.

Cromatografía en fase reversa[8-10], en la cual se utilizan partículas de no menos de 300 Å (300 a 500 e incluso 1000 Å) de porosidad, a diferencia de los rellenos convencionales que tienen poros de 60 a 100 Å. Esto se debe al tamaño de las macromoléculas y a su menor velocidad de difusión, que resulta en un acceso muy restringido al interior de los poros de partículas convencionales.

Cromatografía de interacción hidrofóbica[11]. En este caso las proteinas se separan en base a su fuerza de interacción hidrofóbica con una matriz también hidrofóbica. Los aminoácidos no polares de las proteinas pueden encontrarse sumergidos en el core de la molécula o sobre la superficie, confiriéndole una hidrofobicidad característica. Los grupos superficiales expuestos interaccionan con el relleno de la columna, similar al de fase reversa (grupos alquilo o arilo químicamente unidos a la matriz de sílica), aunque de menor densidad de ligando y son eluídos con soluciones salinas, usualmente gradientes de fuerza iónica.

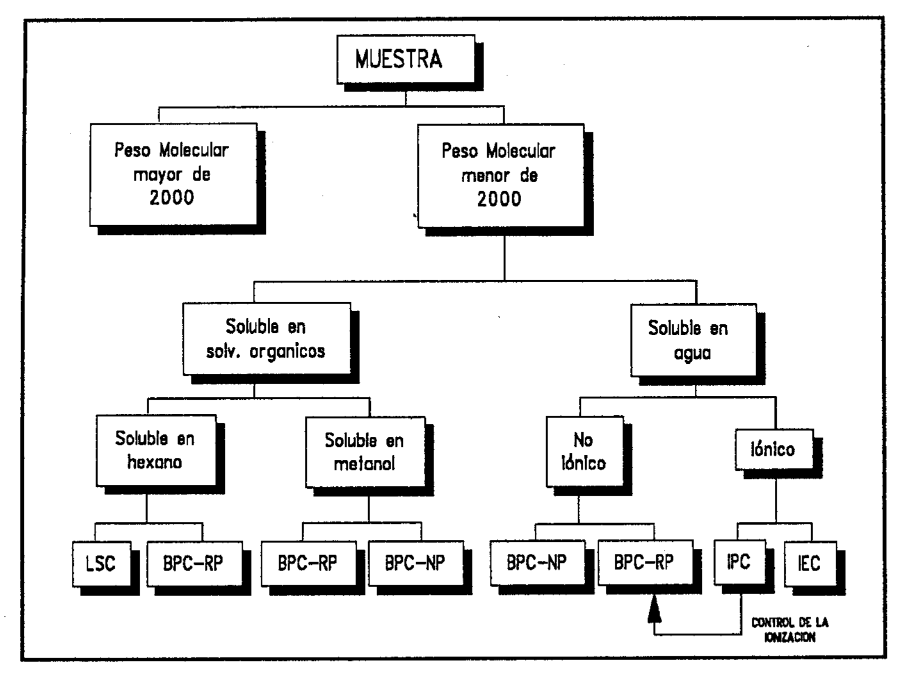


Fig. 11.3. Métodos de primer elección para componentes de peso molecular menor de 2000 Daltons.

Análisis de compuestos de peso molecular menor de 2000

Cuando el analito tiene peso molecular menor de 1000 o 2000 Daltons los caminos, indicados en la figura 11.3, son totalmente distintos. Si la muestra no es soluble en agua o en mezclas hidroalcohólicas, muy probablemente la única alternativa sea la fase normal, ya sea con columnas de silicagel no modificada (LSC) o de fase ligada (BPC-NP). Las columnas de BPC-NP más comúnmente utilizadas contienen grupos ciano o amino ligados a matriz de silicagel y se utilizan con fases móviles no polares.
En el otro extremo, las muestras compuestas por iones (aniones o cationes) inorgánicos son mejor tratados por cromatografía de intercambio iónico (IEC).
Los problemas comprendidos entre ambos extremos, podrán ser resueltos por cromatografía en fase normal (BPC-NP) o reversa (BPC-NP) en alguna de sus modalidades: partición, control de la ionización o cromatografía de apareamiento iónico (IPC).
El método de mayor difusión es, sin duda, la fase reversa (BPC-RP o simplemente RP), debido a sus ventajas y a su versatilidad, aunque existen algunos casos que hacen pensar en primera instancia en otro sistema (tabla 11.I). Por ejemplo, en fase normal (LSC) para

la separación de isómeros geométricos, en columnas quirales para los enantiómeros, o en columnas de grupos amino para los carbohidratos.
Es evidente el poder de la cromatografía líquida para la resolución de los problemas más variados. Sin embargo, la descripción de los pasos en el desarrollo analítico en cada una de estas metodologías sería muy extensa y está fuera del alcance de este libro, por lo que se dará énfasis a la fase reversa y sus variantes, sin duda la más empleada.

Fase reversa

Decidido el punto de partida, es claro que deberá definirse un sistema: tipo y características de la columna, fase móvil, caudal, detector, y masa a inyectar, por ejemplo:

- Columna — silicagel químicamente unida a ODS (C18).
- Fase móvil — mezclas agua-modificador (MeOH o AcN).
- Caudal — 1.0 ml/min
- Detección UV — a longitud de onda correspondiente al máximo de absorción. 190-210 nm o 254 nm para muestras desconocidas.
- Muestra — hasta 100 µg en 20 µl.

De ser posible, la primer inyección se efectúa con una cantidad considerable de muestra para verificar la elución del analito. Así evitamos confundir el pico buscado con otros picos que eluyen en el volumen muerto o durante el ensayo. Se reduce luego su masa hasta una respuesta no mayor de 0.5 AUFS. De este modo se tiene cierta garantía de trabajar dentro del rango lineal de un detector UV, aunque esto deberá ser verificado posteriormente durante la validación.
Respecto de la determinación de la proporción agua-modificador orgánico (MeOH-AcN-THF) adecuada, pueden seguirse tres caminos:

1. Comenzar con una concentración "media" de modificador (50 % de MeOH o AcN en agua) y ajustar la proporción según los resultados obtenidos.
2. Comenzar con una concentración alta de modificador (fase móvil muy "fuerte"), reduciendo luego su proporción en fracciones de 10-20 % según los resultados.
3. Efectuar un gradiente de elución y calcular la composición adecuada para un solvente isocrático.

El inconveniente del primero de los métodos es que si no se tiene noción de la cantidad y tipo de componentes de la muestra, es posible que el tiempo necesario para la elución de los picos más retenidos sea muy alto, pudiéndose "perder" algún pico por fusión con la línea de base o, como ocurre frecuentemente, puede darse por terminada una corrida sin que eluyan todos los picos de interés. En este caso, a veces eluyen como un pico fantasma en la próxima inyección y se hacen notar debido a su ancho de base, demasiado amplio para "ese sector" del cromatograma.
La ventaja del segundo método (figura 11.4) está en el hecho de partir de un punto conocido: probablemente todos los constituyentes de la muestra eluyan en las proximidades del volumen muerto. Si en esas condiciones el k' es alto, sería recomendable

Compuestos	Métodode Elección	Columna	Fase móvil Aditivos
Neutros *No iónicos*	BPC-RP o RP	C18 - C8 Phe - CN	Agua - modificador (MeOH-AcN-THF)
Acidos débiles	RPLC control de la ionización	C18 - C8 Phe - CN	Agua - modificador ácido fosfórico hasta pH 3 - 3.5
Bases débiles	RPLC	C18 - C8 Phe - CN	Agua - modificador 30 mM trietilamina
Iónicos e ionizables	RPLC de APAREAMIENTO IONICO	Preferida C18 Alternativa C8 - CN	Agua - MeOH ❑ alquilsulfonatos pH 3,5 (bases) ❑ tetraalquilamonio pH 7,5 (ácidos)
Lipofílicos *insoluble en solventes hidroalcohólicos*	LSC	CN - NH_2 SILICA	solventes no polares
Iones inorgánicos *Aminoácidos* *Péptidos, derivados de ácidos nucleicos*	IEC	SAX - SCX base silica o polimérica	Agua - modificador pH controlado fuerza iónica controlada
Macromoléculas	SEC IEC	base silica o polimérica	acuosos (GFC) orgánicos (GPC)
Estereoisómeros *Isómeros de posición*	LSC	SILICA	solventes no polares
Enantiómeros *(isómeros ópticos)*	COLUMNA QUIRAL RPLC	QUIRALES C18	acuosos compuestos quirales
Carbohidratos	COLUMNA AMINO	NH_2	agua - modificador

Tabla 11.I. Sistemas cromatográficos según el tipo muestra.

replantear el problema con otro sistema, quizás una fase normal. Desde ese "punto de partida" se reduce progresivamente la proporción del modificador en fracciones, 10 ó 20 %, y luego en proporciones menores, hasta obtener una retención y resolución "razonables" para todos los constituyentes de la muestra.

En el tercer caso se desarrolla un gradiente lineal, de 0 a 100 % de MeOH o AcN, y puede calcularse la composición de la fase móvil para un sistema isocrático según los parámetros descritos por Snyder[12,13]. Este método es propuesto por J. Berridge[14] y complementado con un programa en lenguaje BASIC que permite el cálculo de la composición final de solvente, conociendo los tiempos de retención durante el gradiente, volumen muerto, tiempo de demora (volumen de cámaras de mezclado de solventes y cabeza de la columna) y cambio porcentual de modificador por unidad de tiempo.

Análisis de Compuestos Disociables

Si se trabaja con compuestos neutros, no ionizables, probablemente se requieran pocos ajustes finales para completar el método de análisis. Sin embargo, de existir compuestos acídicos, básicos o ambos simultáneamente, se observarán fenómenos mixtos de retención debidos a la presencia de sus formas iónica y no iónica en un medio pobremente regulado:

$$\mathbf{AH \rightleftharpoons A^- + H^+}$$

En ausencia de regulación de pH, los ácidos débiles estarán en sus formas disociada y no disociada. En fase reversa las formas disociadas se retienen menos favorablemente que las no disociadas. En estos casos el pH de la fase móvil es un verdadero "motor" del analito, y variándolo desde 6 hasta 3, el k' del pico puede variar desde posiciones muy cercanas al frente de solvente hasta valores muy elevados. En las proximidades del pKa, el pico puede presentar asimetría debido a la presencia simultánea de ambas formas. Para corregir este efecto puede ajustarse el pH de modo tal de desplazar el equilibrio hacia la izquierda o derecha, según convenga, o agregar sistemas buffer que modifiquen ese equilibrio. Esta modalidad se conoce como ***control de la ionización*** o ***supresión iónica***. Con las bases ocurre el mismo fenómeno que con los ácidos, sólo que si se desea desplazar el equilibrio hacia la forma no iónica, se necesita un pH que es, en general, incompatible con la integridad de la columna:

$$\mathbf{B + H_2O \rightleftharpoons BH^+ + HO^-}$$

Por ejemplo, según la ecuación de Henderson-Hasselbalch (11-1), si el pK de la base es 7 deberá llevarse el pH a 9 para asegurar que el 99 % de la misma se encuentre en el estado no disociado.

$$\mathbf{pH = pK_a + \log \frac{C_s}{C_a}} \qquad \mathbf{(11\text{-}1)}$$

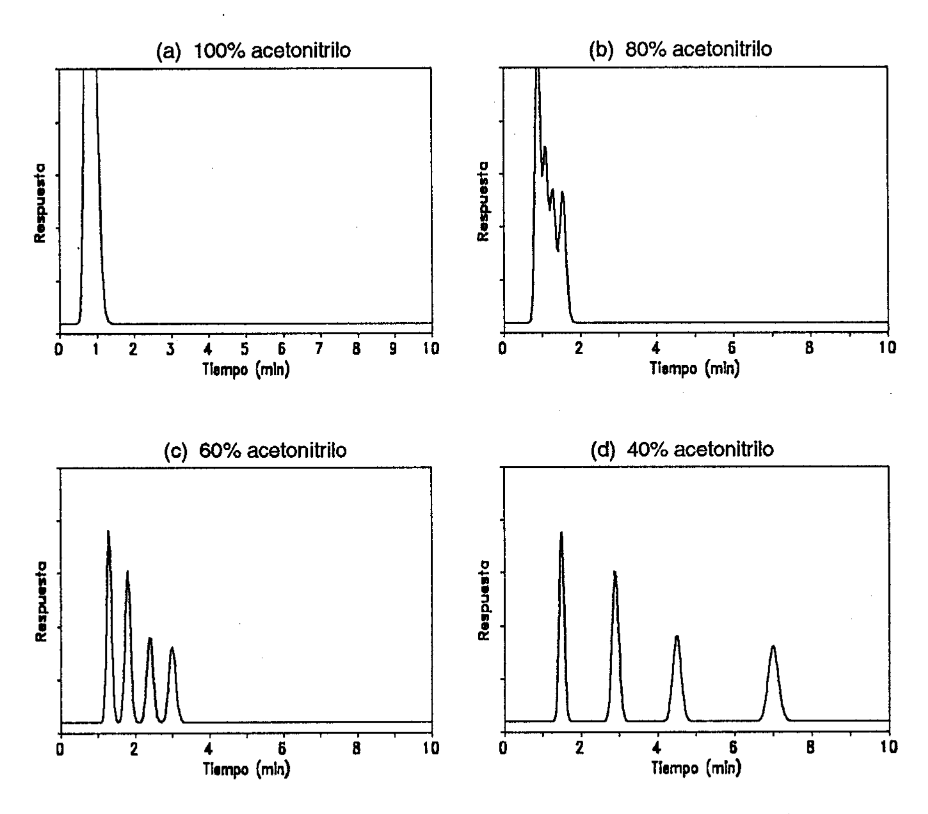


Fig. 11.4. Desarrollo de métodos. Ajuste de la concentración de modificador orgánico.

Estas condiciones no pueden usarse con columnas de fase ligada a silicagel, ya que los pHs superiores a 7-7.5 conducen a la disolución de la matriz. En estos casos es posible recurrir a la cromatografía de apareamiento iónico, pero aún puede intentarse mejorar el método de partición sin llegar a esta alternativa.

Al describirse el proceso de fabricación de la fase ligada pudo verse que a pesar de que se consiga la silanización máxima posible, quedan aún silanoles residuales. Estos silanoles libres están ubicados en zonas muy profundas e inaccesibles en los poros de la partícula de silicagel y son muy pocos los que pueden permanecer en la superficie de la misma, pero son suficientes para justificar mecanismos mixtos de retención. En el caso de las bases pueden darse dos tipos de interacción: mecanismos de fase reversa y de intercambio iónico. Como resultado se obtienen picos muy anchos, con tailing pronunciado.

Conocido el fenómeno, es posible minimizarlo de dos modos diferentes: reduciendo el pH de la fase móvil hasta valores de 3-3.5, adicionando una base a la misma, o bien haciendo ambas cosas simultáneamente.

La disminución del pH tiene por objeto impedir la disociación de los grupos silanoles, para que no puedan actuar como intercambiadores iónicos, mientras la adición de una base "bloquea" por competencia los grupos silanoles residuales. En general, la adición de una amina terciaria, por ejemplo 30 mM de trietilamina (TEA), es suficiente para la corrección del cromatograma. Lógicamente, si el analito fuera una base de igual o mayor fuerza que la TEA puede ser necesario aumentar la concentración de TEA o emplear una amina mas fuerte.

Las figuras 11.5 y 11.6 muestran el efecto del pH y del agregado de una base sobre los cromatogramas de una base nitrogenada. En este caso concreto se deseaba efectuar un control de pureza. Careciendo del estándar de cada impureza, se comparaban los picos secundarios de una solución concentrada con el área del pico principal de una dilución de la misma solución, en una columna de C18, con una fase móvil hidroalcohólica de pH regulado a 7.0 con buffer de fosfatos. Los picos resultaron muy asimétricos, anchos, con una diferencia notable en tiempos de retención entre la solución concentrada y la diluida. El agregado de trietilamina corrigió totalmente este problema y la regulación del pH a 3.0 con buffer de fosfatos permitió suprimir la ionización de posibles estructuras acídicas.

Si no se obtienen resultados satisfactorios por los métodos indicados, puede intentarse la cromatografía de apareamiento iónico (IPC). Esta alternativa, en general se difiere hasta comprobar que la modalidad de partición simple no es adecuada, ya que la IPC no está exenta de limitaciones:

- la columna empleada es, en general, C18 debido a que el "volumen" de la fase ligada ofrece un mejor efecto protector contra la disolución de la matriz de sílica subyacente. Las columnas de grupos funcionales más pequeños son en general menos estables.
- el modificador orgánico más empleado es el metanol. Para conseguir el pH apropiado para asegurar el estado iónico del analito es necesario emplear buffers salinos (por ejemplo de fosfatos), y el metanol es el solvente de RPLC de mayor poder de disolución de sales, menos solubles en AcN y THF.
- los contraiones de apareamiento (alquilsulfonatos, tetraalquilamonio) son difíciles de remover completamente por lavado y quedan retenidos modificando la selectividad de la columna. Esto no representa ninguna dificultad, salvo el tener que reservar la columna para esa única finalidad (sistemas de apareamiento iónico).
- Las sales de tetraalquilamonio complejan la silicagel aumentando su solubilidad, especialmente a pH alcalino.

Por otra parte, las condiciones son muy similares a las descritas para RPLC, es decir, puede comenzarse con el mismo tipo de columna, masa inyectada y detector, agregando el buffer y el contraión a la fase móvil con las siguientes modificaciones:

- Bases: pH 3.0-4.0 regulado con un buffer 0.05-0.1 M fosfórico/fosfato de amonio, hexanosulfonato de sodio 5 mM, en agua - metanol (20:80). La proporción de metanol se va reduciendo hasta conseguir la separación adecuada, manteniendo constantes el pH y la concentración de contraión.

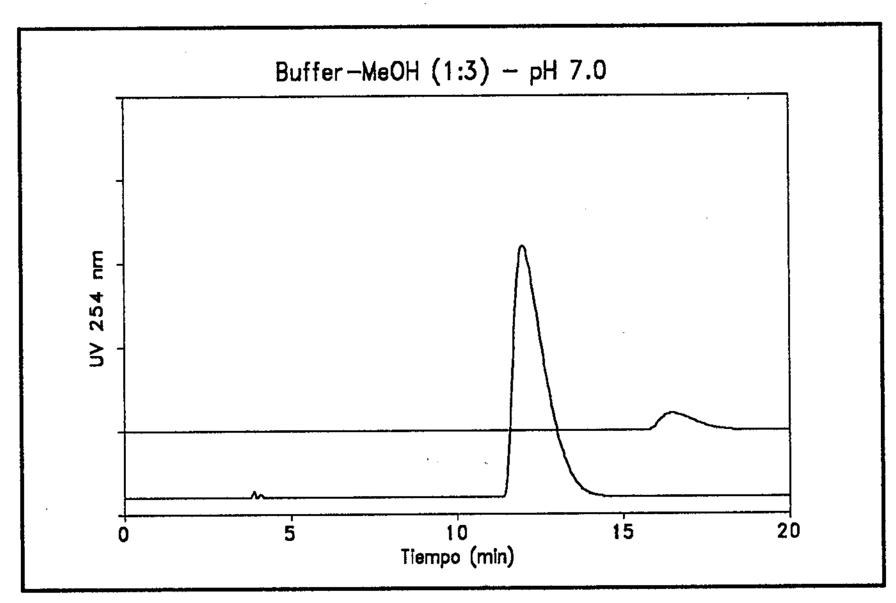


Fig. 11.5. Análisis de una base nitrogenada a 254 nm, empleando LiChroCART RP-18, buffer-MeOH (1:3) a pH 7, 1.0 ml/min. Los cromatogramas superior e inferior corresponden a 5 y 500 mg/dl. Observar asimetría y diferencias en retención.

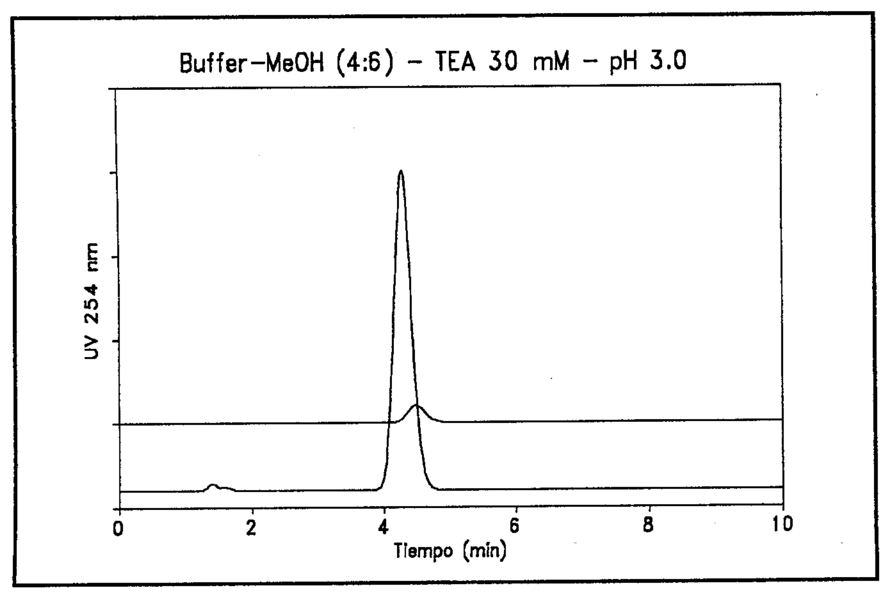


Fig. 11.6. Muestra y condiciones de la figura 11.5, salvo por el empleo de buffer-MeOH (40:60) con el agregado de TEA 30 mM y regulado a pH 3.0.

- Acidos: pH 7.0 - 7.5 regulado con buffer de fosfatos, hidróxido de tetrabutilamonio 5 mM en agua - metanol (20:80). La proporción de metanol se reduce gradualmente como para las bases.

Además de la variación en la proporción del solvente "fuerte", la separación puede controlarse variando la longitud de la cadena hidrocarbonada del contraión (por ejemplo butanosulfonato hasta dodecilsulfonato de sodio para las bases), su concentración (0 a 200 mM), y la fuerza iónica a través de la concentración del buffer. De observarse asimetría con compuestos básicos, puede corregirse agregando trietilamina hasta 1/5 de la concentración del reactivo de apareamiento iónico. El cambio de columna en general no produce cambios apreciables de selectividad y puede llevar a un deterioro más rápido de la misma.

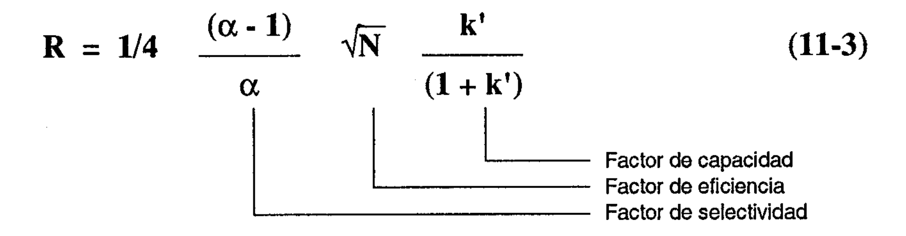
11.2 Optimización de métodos

Ajuste de los parámetros cromatográficos

Una vez que se ha probado exitosamente un sistema (columna-solvente-parámetros instrumentales) de acuerdo a lo indicado, estaremos en presencia de un método preliminar. Este método preliminar debe optimizarse para mejorar al máximo la separación cromatográfica.
El primer paso en el proceso de optimización es el ajuste de los parámetros cromatográficos: R, k', N y α.
El objetivo primario de la cromatografía es la separación de los componentes de una mezcla, y el grado de separación se mide por un parámetro: la **resolución**:

$$\mathbf{R} = \frac{(t_2 - t_1)}{\frac{1}{2}(w_2 + w_1)} \qquad \mathbf{(11\text{-}2)}$$

Esta fórmula de cálculo (11-2) se basa en el gráfico del cromatograma y sólo indica que para mejorar la resolución, los picos deberán alejarse tanto como sea posible y que sus anchos de base deberán ser pequeños, sin mostrar como lograrlo, es decir, sin exponer las variables que la gobiernan. Sin embargo, sustituyendo las fórmulas de k' (11-4), N (11-5) y (11-6) en la ecuación de resolución y luego de una serie de operaciones algebraicas, podemos llegar a (11-3).



$$R = 1/4 \; \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \; \sqrt{N} \; \frac{k'}{(1 + k')} \qquad (11\text{-}3)$$

Esta ecuación está compuesta por tres parámetros distintivos e independientes: el factor de selectividad, dependiente de α, el factor de eficiencia, dependiente de N, y el factor de capacidad, dependiente de k', y son éstos los parámetros sobre los que se debe trabajar para modificar la resolución.

Regulación del k'

El factor de capacidad, k', se calcula como:

$$k' = \frac{(t_n - t_o)}{t_o} \qquad (11\text{-}4)$$

Siendo t_n el tiempo de retención del pico de interés y t_0 el tiempo del volumen muerto. Puede variar entre k'= cero (si $t_n = t_0$) para los compuestos no retenidos e infinito ($t_n = \infty$), para los retenidos irreversiblemente. k' es el parámetro más sencillo de modificar: se varía simplemente ajustando la fuerza de la fase móvil (ver figura 11.4). Es conveniente recordar las siguientes reglas, válidas para cromatografía en fase reversa:

- a mayor proporción de agua mayor k', o sea, mayor retención.
- a mayor proporción de modificador (MeOH, AcN, THF) menor k', es decir, menor retención.
- Cambios en el pH de la fase móvil no modifican la retención de compuestos neutros.
- Cambios en el pH de la fase móvil producen enormes modificaciones en la retención de solutos disociables.
- en IPC, la retención aumenta al aumentar la longitud de la cadena alquílica y la concentración del apareante.

En la figura 11.7 puede verse que la resolución aumenta al aumentar el k'. Sin embargo, la resolución no varía linealmente con el k' sino con k'/(1+k'), de modo tal que un aumento en la retención produce importantes modificaciones en la resolución sólo si $k' < 6$.

Para valores mayores, la función se hace asintótica y la resolución no varía significativamente. Es decir, un aumento desmedido de k' no se reflejará en la resolución aunque sí en un excesivo tiempo de análisis, en el achatamiento de picos con reducción de la sensibilidad (mayor tiempo de retención, igual área, menor altura), y dificultad de cuantificación.

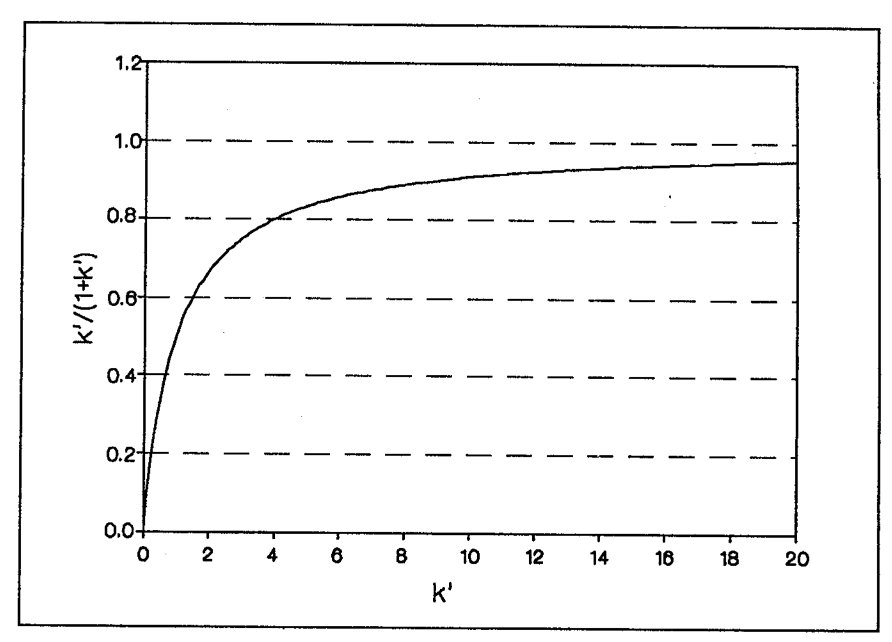


Fig. 11.7. Influencia del factor de capacidad sobre la resolución. El valor máximo está en k' infinito, pero a partir de k'>10, es poco lo que mejora la resolución al reducir la fuerza del solvente.

Por otra parte, podemos ver en la figura 11.7 que si k'= 0, R= 0, es decir, **no hay resolución**. De acuerdo a lo indicado, podemos definir los rangos de k' apropiados: 2 < k' < 6 para sistemas simples, con 2-3 picos, 2 < k'< 10 para muestras con mayor número de picos, y 0.5 < k' < 20 para muestras muy complejas.

Snyder[15] introduce otro concepto: **Rx**, calculado como el cociente entre el k' del último pico de interés y el k' del primer pico de interés, y recomienda efectuar un gradiente de elución si Rx es mayor de 20, un k' máximo de 20 si Rx=20, y un k' máximo pequeño si Rx es mucho menor de 20.

Regulación de la Eficiencia

Como puede deducirse de la ecuación (11-3), la eficiencia aumenta al aumentar el valor de N, es decir, el número de platos teóricos. N se calcula según:

$$N = 16 \left(\frac{t_n}{w_{tan}} \right)^2 \qquad \textbf{(11-5)}$$

Donde t_n es el tiempo de retención del pico enésimo y w_{tan} el ancho de pico, medido entre las tangentes a los puntos de inflexión y la línea de base.

N puede aumentarse de varias formas:

- Disminuyendo el caudal (véase ecuación de Van Deemter, sección 3.4).
- Empleando columnas más largas.
- Usando partículas de menor diámetro.
- Empleando más columnas (acopladas).
- Aumentando la temperatura.
- Empleando columnas "nuevas" o regeneradas.
- Optimizando el equipo (menor longitud de tubuladuras, menores volúmenes muertos, etc.)

N	$\sqrt{N}$
10000	100.0
20000	141.4
40000	200.0

Tabla 11.II. Influencia de N sobre la resolución.

Como puede verse en la tabla 11.II, la resolución no varía linealmente con la eficiencia (N), sino con su raíz cuadrada. Así por ejemplo, para duplicar la resolución no basta duplicar sino que es necesario cuadruplicar el valor de N. Los métodos más usuales empleados para incrementar N son, la disminución del caudal (velocidad lineal) para acercarnos al óptimo, la reducción del tamaño de partícula y el empleo de columnas más largas. El acoplamiento de columnas en general no es equivalente a emplear una columna más larga (para la misma longitud final), debido a lós conectores que necesita adicionarse, que crean volúmenes muertos y aumentan los disturbios en la banda de separación. Por otro lado, debe considerarse que la presión del sistema aumenta linealmente con la longitud de la columna. Es decir, que una duplicación en la longitud de la columna conduce a una duplicación en la presión del sistema, con el consecuente desgaste que ello ocasiona, mientras que la resolución mejora sólo 1.4 veces ($\sqrt{2}$).
El efecto del aumento de N sobre el cromatograma puede observarse en la figura 11.8 y se visualiza (si no existen cambios en k' y en α) como un afinamiento de los picos, que continúan con el mismo tiempo de retención, pero con menor ancho de base.

Regulación de la selectividad

La selectividad α se calcula (11-6) como el cociente de los factores de capacidad de un par de picos determinado:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \qquad \textbf{(11-6)}$$

Agotadas las variaciones de k' y de N, si la resolución no es la adecuada se intenta un cambio de selectividad, cambio para el cual no nos orienta la ecuación (11-6) sino el concepto mismo de α.

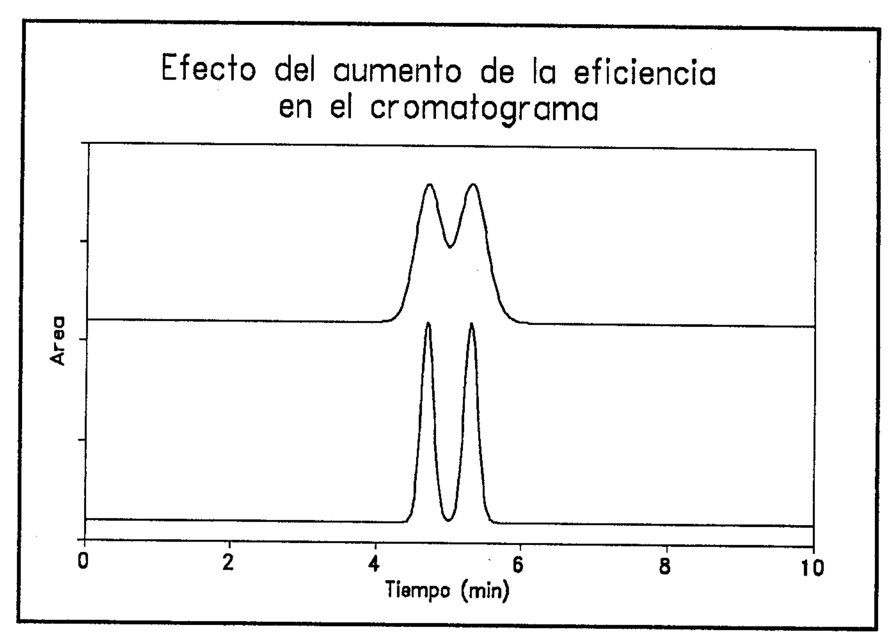


Fig. 11.8. El efecto del aumento de N (curva inferior) se observa como un afinamiento de picos, que no cambian su tiempo de retención.

La selectividad de un sistema depende de la naturaleza de cada uno de sus componentes, fase móvil, columna y muestra, de su afinidad mutua y del modo en que interaccionan entre sí.

Dicho de otro modo, la variación de la resolución deberá ser provista por una modificación más o menos profunda en uno de los componentes fundamentales del sistema cromatográfico, columna o fase móvil, y el resultado del cambio puede ser completamente imprevisto: la resolución puede ser mejor, pero también peor.

Habitualmente las modificaciones de α se consiguen cambiando las propiedades químicas de los solventes de elución. Así, el cambio de MeOH por AcN o THF puede resultar en grandes diferencias en la separación. Fundamentalmente en este punto la HPLC se diferencia de la GC. En GC un cambio de α implica necesariamente un cambio de columna, mientras que en HPLC sólo recién después de agotar toda gama previsible de solventes, pHs y apareantes, se recurre al cambio de columna como modo de cambiar α.

La variación incorporada puede ser aleatoria, recurriendo a ensayos prueba-error. De hecho este sistema puede dar buenos resultados con muestras sencillas pero como fue indicado, es preferible una aproximación sistemática al problema de modo de optimizar tiempos y variables. Una explicación detallada de los métodos de selección se describe más adelante.

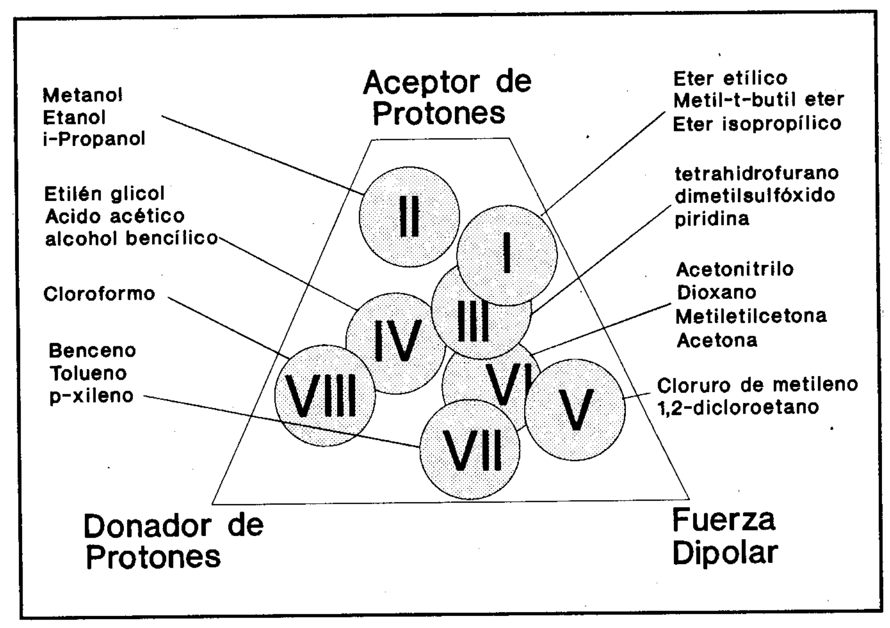


Fig. 11.9. Triángulo de selectividad de solventes propuesto por Snyder[13] según el tipo y magnitud de interacción. Adaptado de ref. 19, con permiso del editor.

Selección de la fase móvil

La selectividad de la fase móvil depende del tipo de interacción de la misma con la muestra. Las interacciones pueden ser de tipo dispersivo, dipolar, por puente de hidrógeno, interacciones dieléctricas, o una combinación de ellas. No solo la "polaridad" sino la suma todas estas propiedades es la que define la afinidad de la fase móvil por un analito dado, que tendrá a su vez determinadas características dipolares, aceptoras o donadoras de protones.

La magnitud de las interacciones para cada solvente está tabulada[16,17], y fue a la vez clasificada por Snyder[18] según su selectividad (ver figura 11.9) en 8 grupos distintivos desplegados en un diagrama triangular.

Visto de ese modo es claro que si la resolución con un determinado solvente es insuficiente, es poco el cambio que se conseguirá al cambiar ese solvente por otro del mismo grupo, ya que el tipo de interacción con la muestra será similar. Por ejemplo, si se desea cambiar la selectividad de una mezcla hidrometanólica, no debe cambiarse el metanol por otro alcohol sino por un solvente perteneciente a otro grupo, preferentemente alejado de aquel cuya respuesta se conoce, por ejemplo, acetonitrilo o tetrahidrofurano en fase reversa.

Así, los vértices del triángulo (solventes de mayor diferencia de selectividad) en fase

Solvente	Fuerza de elución
Agua	0.0
Metanol	2.6
Acetonitrilo	3.2
Tetrahidrofurano	4.5

Tabla 11.III. Fuerza de elución de solventes en fase reversa (de referencia 28).

reversa son MeOH, AcN y THF, empleando agua como solvente de soporte, mientras en fase normal son el eter (se prefiere el empleo de metil-isobutil éter y no éter etílico), cloroformo y cloruro de metileno en mezcla con hexano, o FC-113 (1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano), sugerido por Glajch[19] por su baja inflamabilidad, toxicidad y buena transparencia al UV.

Para conseguir un cambio efectivo de selectividad en fase reversa se procede del siguiente modo:

1. Se ajusta la concentración del modificador (por ejemplo para una fase móvil agua-metanol) para conseguir un k' comprendido entre 2 y 10.
2. Se calcula la composición de las mezclas agua-acetonitrilo y agua-THF de igual fuerza de elución. Esto se consigue calculando la fuerza total de cada mezcla según Snyder:

$$ST = \sum_{i=1}^{n} S_i \quad \Phi_i \qquad (11\text{-}7)$$

Donde ST es la fuerza total de la fase móvil, S_i la fuerza (indicada en la tabla 11.III) y Φ_i la fracción en volumen del solvente **i**. Así, para la mezcla hidrometanólica:

$$ST_{MeOH} = S_{MeOH} \quad \Phi_{MeOH} + S_{H_2O} \quad \Phi_{H_2O} \qquad (11\text{-}8)$$

$$S_{MeOH} \quad \Phi_{MeOH} = S_{AcN} \quad \Phi_{AcN} = S_{THF} \quad \Phi_{THF} \qquad (11\text{-}9)$$

$$\Phi_{AcN} = \frac{S_{MeOH} \quad \Phi_{MeOH}}{S_{AcN}} \qquad (11\text{-}10)$$

$$\Phi_{AcN} = \frac{S_{MeOH} \quad \Phi_{MeOH}}{S_{AcN}} \qquad (11\text{-}11)$$

Por ejemplo, una mezcla agua-MeOH (30:70) tendrá aproximadamente la misma fuerza de elución que una mezcla agua-AcN (43:57) o una mezcla agua-THF (60:40).

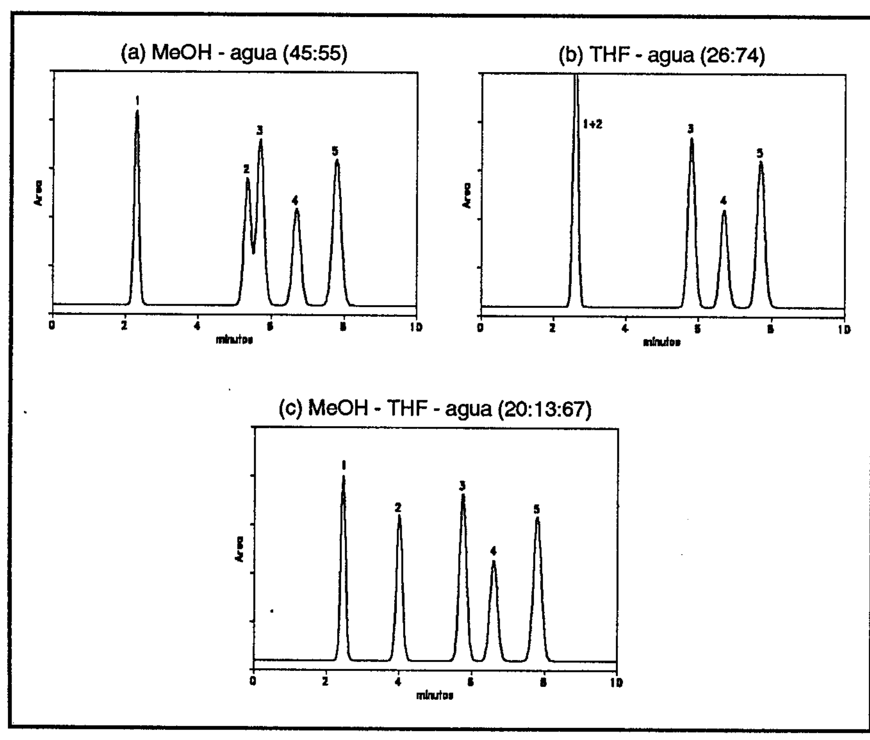


Fig. 11.10. Efecto del modificador orgánico sobre la resolución y selección de una fase móvil ternaria en base a los resultados.

3. Se efectúan ensayos empleando las mezclas agua-AcN y agua-THF.
   La simple observación de los cromatogramas resultantes indicará si el cambio de selectividad fue satisfactorio como para reemplazar el solvente inicial o inclusive, si cabe considerar una mezcla ternaria compuesta por mezcla 1:1 del primero (MeOH-agua) con el segundo (AcN-agua) o con el tercero (THF-agua), o bien del segundo con el tercero. Los cromatogramas de la figura 11.10 muestran un problema resuelto de esta forma.

Mapas de Resolución

Los casos más complejos que no pueden resolverse por apreciación directa son tratados en forma más conveniente por medio de mapas de resolución, con ayuda de una computadora. Este modelo de optimización fue propuesto por Snee[20], y aplica un diseño factorial, en el cual estudia la respuesta sobre un triángulo (figura 11.11) definido por los tres solventes en 10 puntos característicos:
los 3 vértices del triángulo, los 3 puntos medios de cada cara, el punto medio (mez-

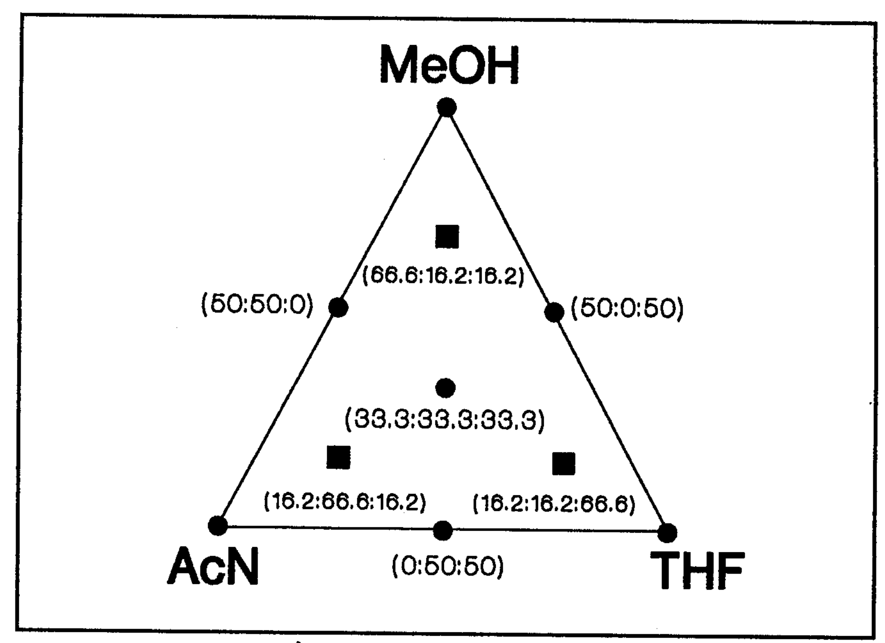


Fig. 11.11. Puntos de ensayo sobre el triángulo, mostrando los puntos para la determinación de los coeficientes polinomiales (●) y los opcionales, para la determinación del ajuste (■). (Adaptado de referencia 19, con permiso del editor).

cla 1:1:1), y los tres puntos centrales de los triángulos formados por los puntos medios (4:1:1).

Glajch y colaboradores[19] adaptaron el modelo de Snee sobre el triángulo de selectividades de Snyder, evaluando la respuesta en 7 puntos y reservando los 3 restantes para comprobar el ajuste al modelo.

La secuencia del estudio comprende los tres primeros pasos descritos anteriormente para la búsqueda de las mezclas agua- modificador (MeOH-AcN-THF) con $2 < k' < 10$. Estos pasos corresponden a los vértices del triángulo, y se completan con los siguientes:

4. Aplicación del diseño estadístico para la búsqueda de la fase móvil óptima. Se efectúan 7 inyecciones de la muestra en diferentes condiciones. Los puntos se indican en la tabla IV.

5. Evaluación de los resultados.

Resulta claro que la calidad de un cromatograma puede ser juzgada por apreciación visual. Sin embargo, la evaluación cuantitativa de la calidad de separación (tomada en términos de resolución y tiempo de análisis) es indudablemente menos subjetiva, y permite aplicar evaluaciones globales y diseños de optimización como el presente.

# Ensayo	%MeOH	%AcN	%THF	COF
1	100	0	0	...
2	0	100	0	...
3	0	0	100	...
4	50	50	0	...
5	0	50	50	...
6	50	0	50	...
7	33	33	33	...

Tabla IV. Puntos de ensayo. Los solventes corresponden a los hallados en los puntos 1 a 3, y los valores de COF (ver texto), se completan con los resultados obtenidos en el punto 5.

El criterio propuesto por Glajch[19] es el cálculo del factor de optimización cromatográfica (COF), dado por

$$\mathbf{COF} = \sum_{i=1}^{n} A_i \ln\left(\frac{R_i}{R_{id}}\right) + B\ (t_m - t_i) \qquad \mathbf{(11\text{-}12)}$$

Donde R_i y R_{id} son las resoluciones obtenida y la deseada para el par de picos "i", A es un factor arbitrario de peso (para atribuir mayor o menor influencia a un par determinado), t_m el tiempo de análisis máximo aceptable, t_i la el tiempo de retención del último pico y B el factor de peso para el tiempo de análisis.

Naturalmente, si la resolución de todos los pares de picos es igualmente importante A vale 1, y si el tiempo de análisis tampoco importa, B vale cero.

Queda por definir el cálculo de la resolución, que para pares bien resueltos y simétricos está dado por la ecuación (11-2).

Sin embargo, si los picos están parcialmente solapados es preferible efectuar el cálculo tomando los anchos de picos a media altura (w_{h2} y w_{h1}), evaluando la resolución como:

$$\mathbf{R} = \frac{1.18\ (t_2 - t_1)}{(w_{h2} + w_{h1})} \qquad \mathbf{(11\text{-}13)}$$

Superposiciones muy severas o casi completas son aún difíciles de calcular por estos procedimientos, pero pueden ser aproximadas por comparación visual con gráficos simulados, como los descritos por Snyder y Kirkland[17].

Calculada la resolución, y obtenidos los factores de optimización (COF), se calcula la respuesta superficial sobre el triángulo de selectividades, que sigue una ecuación polinomial de la forma:

$$\mathbf{Y = AX + BY + CZ + DXY + EXZ + FYZ + GXYZ}$$

Donde A, B, C, D, E, F y G son los coeficientes correspondientes a la respuesta medida (COF), y su valor está dado, llamando a, b y c a los tres solventes (mezclas de agua con MeOH, AcN y THF) por:

$$A = Ya \qquad B = Yb \qquad C = Yc$$

$$D = Yab - 2\,(Ya+Yb) \qquad E = Yac - 2\,(Ya+Yc) \qquad F = Ybc - 2\,(Yb+Yc)$$

$$\mathbf{G = 27\ Yabc - 12\ (Yab+Yac+Ybc) + 3\ (Ya+Yb+Yc)}$$

Estos cálculos, a primera vista muy complejos y evidentemente complicados para el cálculo manual, pueden ser tratados en forma rápida y simple con una microcomputadora con algún lenguaje de alto nivel. Glajch[19] emplea una minicomputadora programada en Fortran, pero Berridge[14] propone un programa más accesible, en lenguaje BASIC (la referencia publica el listado completo), en el cual entrando como datos nombre de las variables (los tres solventes) y valores de COF (u otra respuesta medida), calcula los coeficientes polinomiales, la composición de máxima resolución, y obtiene el gráfico de respuesta en hasta 4 niveles de resolución. La figura 11.12 muestra el resultado obtenido con datos del trabajo de Glajch (separación de una mezcla de nueve naftalenos sustituidos en una columna de C8), empleando el programa de Berridge ligeramente modificado.

Mapas de resolución superpuestos

La desventaja de los mapas de resolución, como fuera señalado por el mismo autor, reside en la poca información acerca de los picos individuales. El mapa corresponde a la respuesta global, para toda la muestra, y no se aprecia la posible inversión del orden de elución de un determinado par de picos, o que sucedería si, por algún motivo, un par determinado deja de tener importancia y se decide apartarlo del problema actual. Glajch sugiere emplear el mismo método de mapeo, pero analizando cada par de picos en forma separada, como un subsistema. Cada par de picos dará lugar a un mapa de resolución y al superponer los mapas individuales, se obtendrá una mejor información del sistema global. Lamentablemente, de este modo no se obtiene una respuesta cuantitativa sobre el sector de máxima resolución debiéndose apreciar en forma visual, aunque sí puede observarse, si ocurre, la inversión del orden de elución de los pares, y permite eliminar un par que deja de tener interés para conocer la respuesta del resto.
El mayor inconveniente de estos sistemas de optimización se encuentra en el tratamiento de muestras desconocidas y cuando no existen estándares que permitan discriminar el orden de elución de los componentes de la muestra. Esta observación no resulta gratuita ya que el orden de elución puede cambiar al cambiar la selectividad de la fase móvil. La evaluación del área de cada pico puede ser una solución precaria, aunque se prefieren otros medios, como los ofrecidos por el detector de ordenamiento de fotodiodos, los espectrofotométricos de detección dual, etc, descritos en el capítulo siguiente para la determinación de selectividad.

```
MAPAS DE RESOLUCION                              Respuesta: COF (Rd: 1.8)
NAFTALENOS - J. Chromatogr. 199(1980)57

LOS COEFICIENTES DE LA POLINOMIAL Y=AX+BY+CZ+DXY+EXZ+FYZ+GXYZ SON

COEFICIENTE 1          -1.8
COEFICIENTE 2          -5.78
COEFICIENTE 3          -3.21
COEFICIENTE 4          15.08
COEFICIENTE 5          -1.54
COEFICIENTE 6           4.339999
COEFICIENTE 7          33.21

NIVEL GRAFICO HASTA -2.5 = ...
NIVEL GRAFICO HASTA -2   = ---
NIVEL GRAFICO HASTA -1.5 =
NIVEL GRAFICO HASTA -1   =
NIVEL GRAFICO SOBRE -1   =

La respuesta máxima es  0.28 a (SV1:SV2:SV3)  60.0 : 35.0 : 5.0
Equivalente a:       (AcN:THF:MeOH:H2O) 31.2 : 13.7 : 3.1 : 52.0

                              MeOH
                               0
                              5 .. 100
                           10 .... 95
                          15 ...... 90
                        20 ........ 85
                       25 .......... 80
                      30 ......--.... 75
                     35 ....------.... 70
                    40 ....--    --.... 65
                   45 ..----      --.... 60
                  50 ..--          --.... 55
                 55 ..--            --.... 50
                60 ..--              --.... 45
               65 ..--                --.... 40
              70 ..                    --.... 35
             75 ..                      --.... 30
            80 --                         ...... 25
           85 --                          -...... 20
          90 --                            --...... 15
         95 --                              ........ 10
        100                                 --........ 5
                                             .......... 0
     AcN  0 5 1 1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 8 9 9 1     THF
            0 5 0 5 0 5 0 5 0 5 0 5 0 5 0 5 0 5 00
```

Fig. 11.12. Aplicación de programa BASIC (Berridge[14] modificado) para el mapeo de resolución de una mezcla de 9 naftalenos (de referencia 21, con autorización del editor).

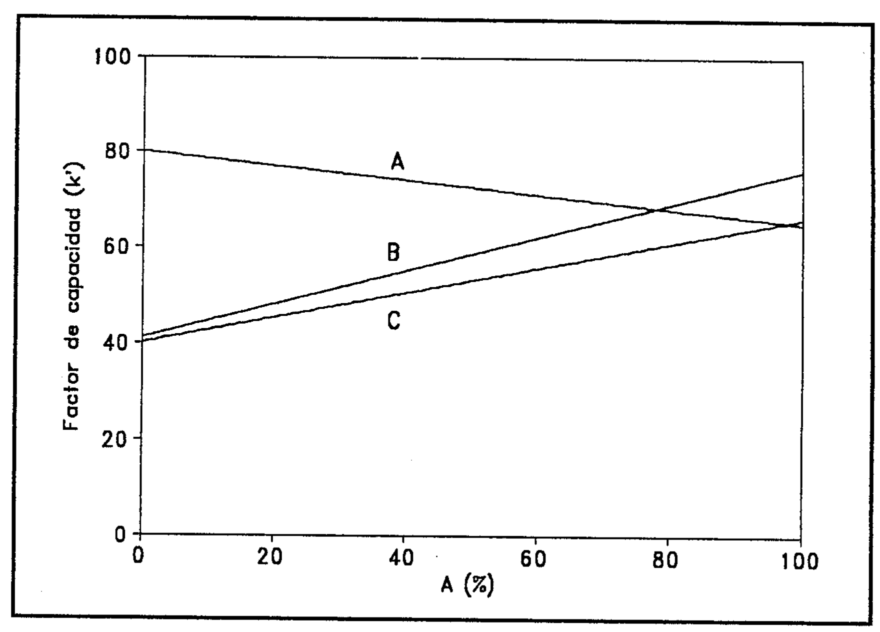


Fig. 11.13. Factor de capacidad en función de la composición de la fase estacionaria (adaptado de referencia 21).

Diagrama de Ventanas

En muchos casos, la optimización no debe efectuarse sobre todo el sistema sino sólo sobre una variable discreta del mismo, por ejemplo el pH o la fuerza iónica.

El diagrama de ventanas desarrollado por Laub y Purnell[22] para la optimización en GLC resulta muy sencillo y fácilmente aplicable a la cromatografía líquida. Como es de esperar, los datos se manejan con mayor seguridad y rapidez por medio de una microcomputadora, aunque es posible realizar cálculos y gráficos en forma manual con resultados similares. En GLC es frecuente trabajar con fases estacionarias mixtas, mezcla de dos soportes de diferente selectividad. Laub y Purnell encontraron que existe una correlación lineal entre los factores de capacidad y la composición de la fase estacionaria, lo que permite predecir el factor de selectividad para cada composición individual.

Por ejemplo, la figura 11.13 muestra el diagrama de los k' de tres analitos hipotéticos en función de la proporción de la fase estacionaria A (B se obtiene por defecto). El diagrama de ventanas propuesto consistía simplemente en graficar el factor de selectividad (α) obtenido a partir de las rectas estimadas de k', en función de las mismas proporciones de A y B, pero con un pequeño artificio: siempre se toma el α de cada par como el cociente entre el k' de pico de mayor retención y k' del de menor retención, es decir $\alpha = k'_B/k'_A$, pero si se produce una inversión del orden de elución del par de picos, a partir de ese punto $\alpha = k'_A/k'A_B$.

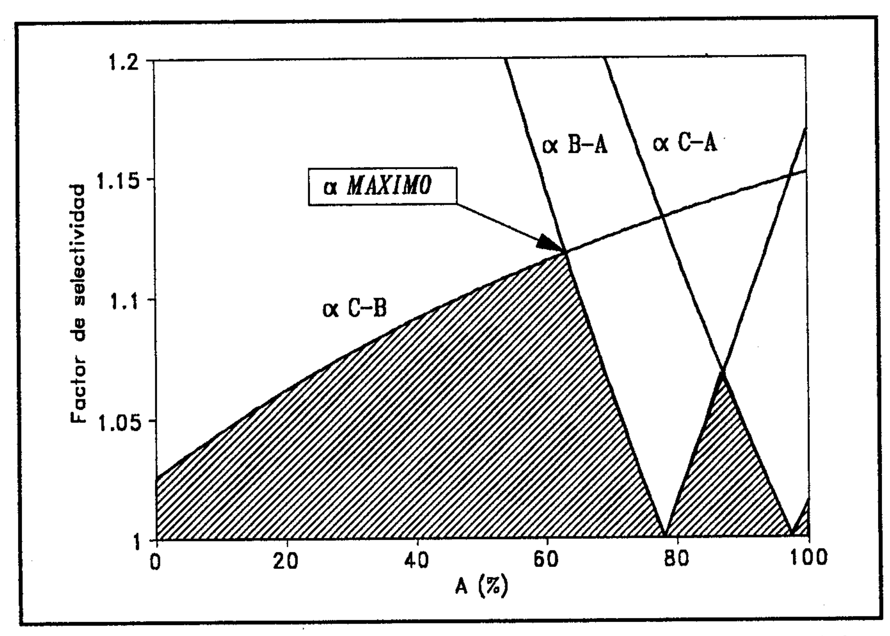


Fig. 11.14. Diagrama de ventanas correspondiente a la figura 11.13. Se indica el punto óptimo, con el mayor α para el par peor resuelto (de referencia 21).

El resultado es, como se ve en la figura 11.14, una serie de curvas que definen áreas (las ventanas) en forma de "V" invertidas.

El vértice superior de cada ventana representa el mayor α posible para un par de picos dado, y el vértice de la ventana mayor es el punto de mayor α para el par de picos peor resuelto, es decir, el punto óptimo para todo el sistema.

Este modelo fue tomado y adaptado a HPLC por Deming y Turoff[23] para la separación de ácidos orgánicos con el pH como variable, y luego por otros autores[23-27], introduciendo algunas alternativas a la evaluación de la separación: $(t_2 - t_1)$, t_2/t_1, log α , etc.

Jones y Wellington[27] utilizan el **factor de separación** (11-14), que resulta más cómodo ya que evita la determinación del volumen muerto, y permite un tratamiento conveniente con una planilla electrónica:

$$\textbf{Factor de separación} = S = \frac{(V_b - V_a)}{(V_b - V_a)} \qquad \textbf{(11-14)}$$

Donde V_b y V_a corresponden a los volúmenes de elución de los picos **b** y **a**, aunque para mayor comodidad se toman los tiempos de retención en lugar de los volúmenes.

Como ejemplo, pueden analizarse datos bibliográficos aportados por Wakisaka y col.[28]

para la separación de bases de DNA en fase reversa en una hoja de cálculos (se indica fila y columna para cada celda):

	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2		Parámetro		Tiempo de retención (minutos)				
3								
4		pH		Adenina	Timina	Guanina	Citosina	
5		2.5		5.8	8.4	4.7	3.3	
6		3.0		8.0	8.4	6.1	3.3	
7		3.5		11.6	8.4	7.0	3.2	
8		4.0		19.9	8.4	7.8	3.2	
9								
10				S = (Ta-Tb)/(Ta+Tb)				
11				A-T	A-G	A-C		
12				0.183	0.105	0.275		
13				0.024	0.135	0.416		
14				0.160	0.247	0.568		
15				0.406	0.437	0.723		
16								
17				T-G	T-C	G-C		
18				0.282	0.436	0.175		
19				0.159	0.436	0.298		
20				0.091	0.448	0.373		
21				0.037	0.448	0.418		

Las fórmulas empleadas para los cálculos son (indicando posición de cada celda):

```
D12: (F3) [W8] @ABS(((E6)-(F6))/((E6)+ (F6)))
E12: (F3) [W8] @ABS(((E6)-(G6))/((E6)+(G6)))
F12: (F3) [W8] @ABS(((E6)-(H6))/((E6)+(H6)))
D13: (F3) [W8] @ABS(((E7)-(F7))/((E7)+ (F7)))
E13: (F3) [W8] @ABS(((E7)-(G7))/((E7)+(G7)))
F13: (F3) [W8] @ABS(((E7)-(H7))/((E7)+(H7)))
D14: (F3) [W8] @ABS(((E8)-(F8))/((E8)+ (F8)))
E14: (F3) [W8] @ABS(((E8)-(G8))/((E8)+(G8)))
F15: (F3) [W8] @ABS(((E8)-(H8))/((E8)+(H8)))
D15: (F3) [W8] @ABS(((E9)-(F9))/((E9)+ (F9)))
E15: (F3) [W8] @ABS(((E9)-(G9))/((E9)+(G9)))
F15: (F3) [W8] @ABS(((E9)-(H9))/((E9)+(H9)))
D18: (F3) [W8] @ABS(((F6)-(G6))/((F6)+(G6)))
E18: (F3) [W8] @ABS(((F6)-(H6))/((F6)+ (H6)))
F18: (F3) [W8] @ABS(((G6)-(H6))/((G6)+(H6)))
```

```
D19:  (F3) [W8]  @ABS(((F7)-(G7))/((F7)+(G7)))
E19:  (F3) [W8]  @ABS(((F7)-(H7))/((F7)+(H7)))
F19:  (F3) [W8]  @ABS(((G7)-(H7))/((G7)+(H7)))
D20:  (F3) [W8]  @ABS(((F8)-(G8))/((F8)+(G8)))
E20:  (F3) [W8]  @ABS(((F8)-(H8))/((F8)+(H8)))
F20:  (F3) [W8]  @ABS(((G8)-(H8))/((G8)+(H8)))
D21:  (F3) [W8]  @ABS(((F9)-(G9))/((F9)+(G9)))
E21:  (F3) [W8]  @ABS(((F9)-(H9))/((F9)+(H9)))
F21:  (F3) [W8]  @ABS(((G9)-(H9))/((G9)+(H9)))
```

En esta planilla, se construye una plantilla con los tiempos de retención de las bases indicadas en función del pH, y se aplican las fórmulas necesarias para obtener el factor de separación de cada par de picos. El único artificio consiste en tomar los valores en módulo (@ABS), de modo de convertir los valores de S en positivos al detectarse inversión del orden de elución. Finalmente, se construyen los gráficos, de tipo XY:

- Eje X correspondiente a pH, eje Y a tiempos de retención.
- Eje X correspondiente a pH, eje Y a factores de separación.

En el último, puede modificarse la magnitud del eje Y para mejorar la visualización del punto óptimo.
La figura 11.15 muestra los gráficos de retención de estas bases. La visualización de este gráfico, o de la tabla, pueden indicar que a pH 3.5 la separación es adecuada, y probablemente lo sea en muchos casos, pero evidentemente no corresponde a la mejor elección, como puede comprobarse en los diagramas de ventanas de la figura 11.16, en la cual se visualiza el punto óptimo a pH 2.7, y otro punto ligeramente inferior a pH 3.34. Así, los cromatogramas de la figura 11.17 indican claramente la diferencia en resolución, en este caso, con una ventaja adicional, menor tiempo de análisis.

Otros Sistemas de Optimización

La literatura ofrece varios métodos alternativos para la optimización de la selectividad, no comentados aquí por ser, aparentemente, de aplicación más compleja. Entre las referencias[14,15,30] se exponen con claridad otros sistemas de indudable interés.

Tpo. de retención (minutos)
20
15
10
5
0
2.40 2.80 3.20 3.60 4.00
pH
Adenina
Timina
Guanina
Citosina

Fig. 11.15. Grafico de retenciòn de bases de DNA, obtenido con una planilla electrónica.

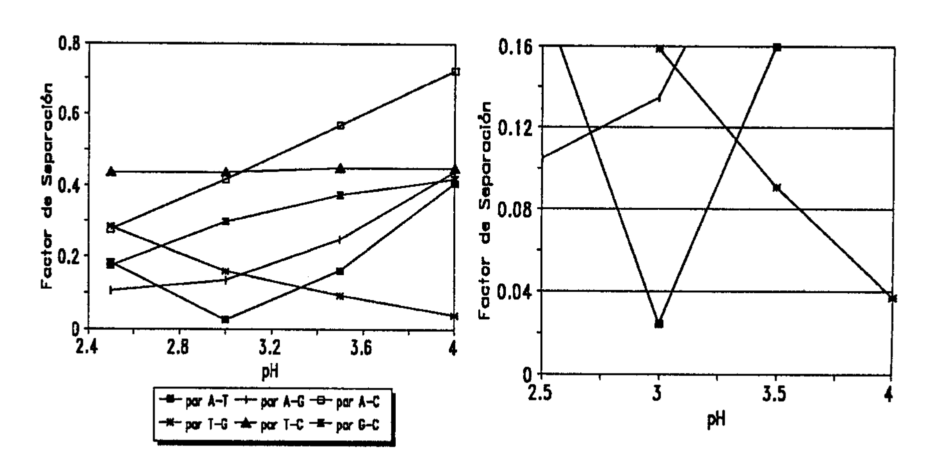


Fig. 11.16. Diagramas de ventana para los compuestos y condiciones experimentales de la figura 11.15. En el diagrama de la izquierda se representan en escala ampliada sólo los pares que determinan el mínimo.

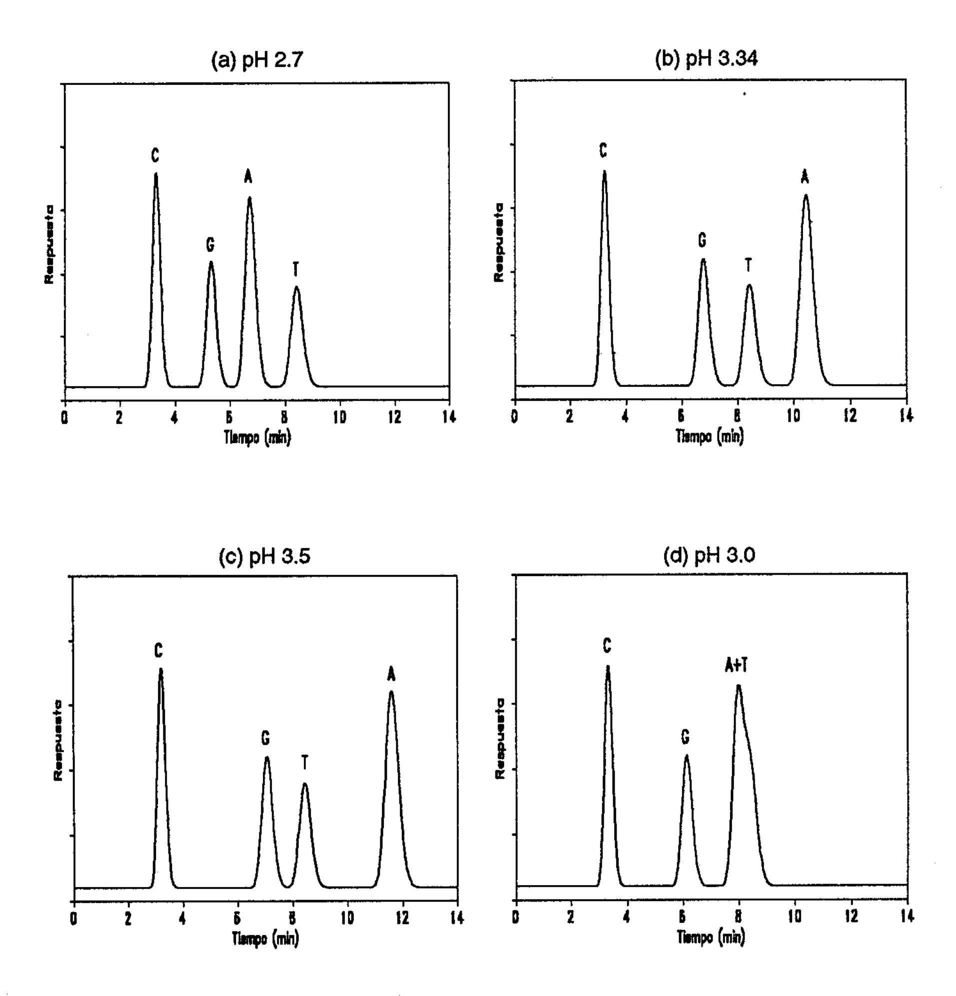


Fig. 11.17. Cromatogramas simulados correspondientes al punto óptimo del diagrama de ventanas (pH 2.7), al segundo vértice (pH 3.34), al que podría haberse escogido por la simple visualización de los datos preliminares (pH 3.5) y a un pH inadecuado (3.0).

11.3 Efectos secundarios

Asimetría

Uno de los problemas frecuentemente encontrados en cromatografía es el tailing o asimetría (sección 3.3), que puede ser anterior (front-tailing) o posterior (back-tailing) respecto del máximo de retención ($As < 1$ o $As > 1$ respectivamente).
La asimetría es normal en cromatografía. Los picos perfectamente gaussianos son realmente infrecuentes, pero es la magnitud de la desviación de ese ideal la que determina que pueda o no tolerarse.
Los problemas derivados del tailing son varios, entre los que se cuentan:

- Separaciones pobres
- Baja precisión
- Baja reproducibilidad entre ensayos

El ensanchamiento de la base del pico es responsable de las separaciones deficientes, mientras la dificultad de integración por indefinición de los límites del pico es responsable de la baja precisión de cuantificación. En general no debe aceptarse un método que presente picos con asimetría superior a 1.5 tomado al 10 % de altura o 2.0 tomado al 5 % de altura.

Las causas que motivan el tailing son variadas, y su solución depende naturalmente de la causa que los origina, entre otras:

- ❑ Efectos secundarios de retención
  - Ejemplo 1: retención de bases por los silanoles residuales de la columna.
  - Solución 1: agregado de una base a la fase móvil que actúe por competencia por los silanoles.
  - Ejemplo 2: presencia de más de una especie ionizable.
  - Solución 2: control de la ionización, modificación del pH.
- ❑ Sobrecarga de muestra
  - Ejemplo: cuantificación de trazas e impurezas, para lo cual se inyecta una masa considerable de muestra.
  - Solución: reducir concentración o volumen de la solución inyectada.
- ❑ Solvente inapropiado
  - Ejemplo 1: falta de capacidad reguladora o fuerza iónica de la fase móvil.
  - Solución 1: aumentar concentración del buffer.
  - Ejemplo 2: solvente de disolución de la muestra inadecuado.
  - Solución 2: disolver en fase móvil.

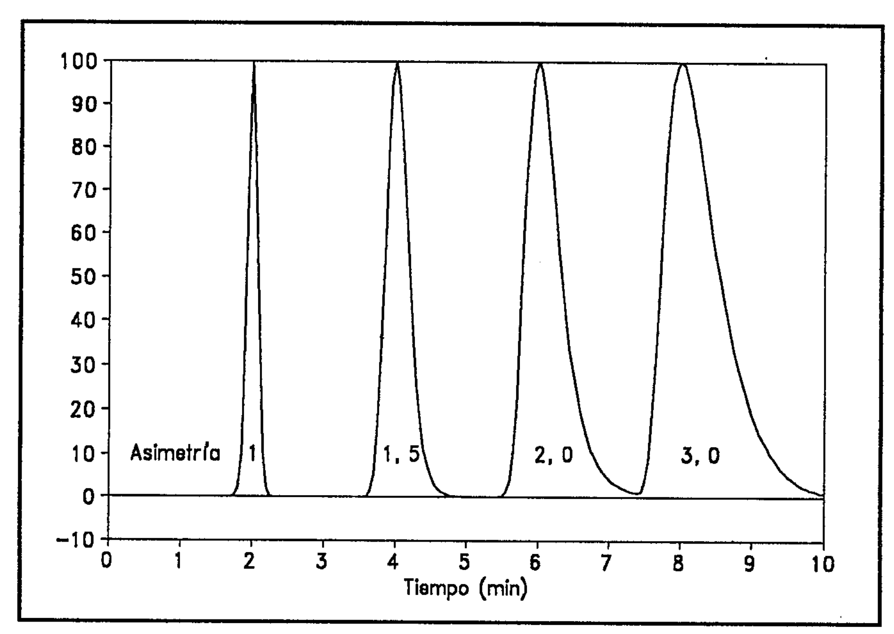


Fig. 11.18. Simulación de picos con diferentes grados de asimetría. El vértice está igualmente espaciado, cada 2 minutos. Notar el ensanchamiento de base y la pérdida asociada de eficiencia.

- Columna deficiente

  Ejemplo: disolución parcial de columna o precolumna, formación de canales intracolumnares, taponamiento parcial de fritados.

  Solución: reparar o reemplazar columna o precolumna.

- Cambio de selectividad de la columna

  Ejemplo: recolección de impurezas en la fase estacionaria, o de agua en fase normal.

  Solución: regenerar o reemplazar la columna.

Referencias

1. Borch, R. F., Anal. Chem. 47, 1797, (1975).
2. Grushka E. y col., J. Chromatogr. 112, 673, (1975).
3. Fitzpatrick F. A., Anal. Chem. 48, 499, (1976).
4. Nagels L. y col., J. Chromatogr. 190, 411, (1980).
5. Unger K., Anspach B., Janzen R., Jilge G., Lork K., "High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives", volumen 5, cap. 1, Csaba Horváth, Academic Press, N.Y., 1988.
6. Walters R., Anal. Chem. 57, 1099A, (1985).
7. Bergold A., Hanggi D., Muller A., Carr P., "High-Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives", volumen 5, cap. 2, Csaba Horváth, Academic Press, N.Y., 1988.
8. Hancock W., Sparrow J., Ibid., volumen 3, cap. 2.
9. Randolph V, DeWald D., "Reversed Phase HPLC of Proteins", Informe Técnico de Baker Chemical Co.
10. Snyder L., Stadalius M., "High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives", volumen 4, cap. 4, Csaba Horváth - Academic Press, N.Y., 1986.
11. Potter R., Lewis R., Ibid., volumen 4, cap. 1.
12. Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R., J. Chromatogr. 165, 3, (1979).
13. Dolan J.W., Gant J.R.; Snyder L.R., J. Chromatogr. 165, 31, (1979).
14. Berridge J.C., "Techniques for the Automated Optimization of HPLC Separations", cap. 3 y apéndice II, J. Wiley, Chichester, 1985.
15. Snyder L., Glajch J., Kirkland J., "Practical HPLC Method Development", J. Wiley & Sons, N.Y., 1988.
16. Solvent Use Index, Waters Associates (83197).
17. Snyder L.R., Kirkland J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2da. ed., J. Wiley, N.Y., 1979.
18. Snyder L.R., J. Chromatogr. 92, 223, (1978).
19. Glajch J., Kirkland J., Squire K., J. Chromatogr. 199, 57, (1980).
20. Snee R.D., Chemtech 9, 702, (1979).
21. Quattrocchi O., Imperiale L., SAFYBI 31, 37, (1991).
22. Laub R., Purnell J., J. Chromatogr. 112, 71, (1975).
23. Deming S., Turoff M., Anal. Chem. 56, 85, (1984).
24. Jenke D., Papenkopf G., Anal. Chem. 56, 85, (1984).
25. Nickel J., Deming S., Am. Lab. 16, 69, (1984).
26. Noyes C., J. Chromatogr. 161, 451, (1978).
27. Jones P., Wellington C., J. Chromatogr. 213, 357, (1981).
28. Wakisaka y col., J. Chromatogr. 162, 319, (1979).
29. Snyder y col., J. Chromatogr. 165, 3, (1979).
30. Ahuja S., "Selectivity and Detectability Optimizations in HPLC", J. Wiley & Sons, N.Y., 1989.

Capítulo 12

Validación de Métodos

12.1 Objetivos de la validación

Una vez desarrollado un método de análisis por HPLC, al igual que toda técnica analítica, deberá validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados por él producidos son confiables.

El objetivo de este capítulo es el de presentar al analista una guía práctica y concreta para encarar una validación analítica apoyada con ejemplos, pero el lector interesado en profundizar estos temas puede recurrir a monografías específicas[1-5], así como a textos complementarios de análisis estadístico[6,7].

En lo referente a los productos farmacéuticos, los métodos codificados en la USP XXII[1] se consideran válidos y el único requerimiento es el cumplimiento del test de adecuación indicado en cada monografía: en general se inyecta una sustancia definida y se verifica que la resolución entre el pico del analito y dicha sustancia sea superior a cierto valor indicado; además, se mide y controla la precisión (RSD), asimetría del pico y eficiencia (N), y se permite ajustar la fuerza de la fase móvil para cumplir estos requerimientos mínimos.

Es importante destacar que la validez de estos métodos es ampliamente discutible. Diferencias entre distintas formas farmacéuticas, tipo y calidad de las materias primas empleadas por cada fabricante, hacen necesario validar la metodología para cada producto en particular, elaborado o semielaborado.

Evidentemente, todo nuevo método analítico debe validarse para demostrar su idoneidad, pero frecuentemente nos encontramos con metodologías antiguas, aplicadas durante mucho tiempo, con las que tiene poco sentido encarar una validación como si fuera una metodología desconocida. Para estos casos, puede definirse una ***validación retrospectiva***, donde se pueden combinar los nuevos criterios de validación con toda la experiencia ya adquirida. En contrapartida, para diferenciarla de la anterior, llamaremos ***validación prospectiva*** a la que encaramos frente a un producto nuevo.

En muchos casos un método analítico es desarrollado y validado por un grupo de trabajo, típicamente el Laboratorio de Desarrollo Analítico y aplicado por otro grupo, por ejemplo el Laboratorio de Control de Calidad. Para asegurar que el laboratorio de aplicación sea capaz de entregar a su vez resultados confiables, es conveniente realizar una ***transferencia de validación***. En el caso de métodos cromatográficos, la transferencia de validación consiste en la comparación de resultados de las pruebas de adecuación y de análisis en paralelo de, al menos, dos muestras homogéneas de concentraciones conocidas, dentro del rango de aceptación del producto o dentro del rango de aplicación de la metodología.

Por otra parte debe considerarse la ***revalidación***. La revalidación se hace necesaria con métodos previamente validados, pero que deben volver a evaluarse por variaciones de algún factor instrumental (cambio de equipo o de alguno de sus componentes, del tipo u origen de columna, etc), de la matriz que contiene la muestra o de la proporción relativa del analito.

En un ensayo de validación deben considerarse los siguientes parámetros, discutidos más adelante:

- Selectividad
- Linealidad
- Precisión
- Exactitud
- Sensibilidad
- Robustez

12.2 Selectividad o especificidad

Este parámetro se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida solo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes, en la matriz de la muestra. Estos componentes pueden ser excipientes de un fármaco, productos de degradación, subproductos o productos laterales de síntesis de una droga, metabolitos del mismo analito en un fluido biológico, etc.

En el caso del análisis de una droga o fármaco, resulta de gran utilidad contar con las materias primas, subproductos de síntesis y productos de degradación. De ser así, la selectividad puede controlarse simplemente por la adición de, por ejemplo, 1 % de cada posible interferente al estándar de droga pura, verificando la separación cromatográfica.

En el caso que los productos de descomposición sean desconocidos o no puedan aislarse, el camino a seguir podría comprender los siguientes pasos (sin descartar una búsqueda bibliográfica previa que permita orientar o sustentar los ensayos a efectuar):

En primer lugar se evalúa la estructura química de la droga y se postulan las posibles rutas de degradación y métodos de ataque. Se pasa luego a un ensayo de degradación artificial, por ejemplo:

1. **Termólisis**, producida por calentamiento de la droga a la temperatura fijada (por ejemplo 105°C).
2. **Hidrólisis**, por calentamiento a reflujo con agua durante 1 hora.
3. **Hidrólisis alcalina**, por calentamiento a reflujo con NaOH 1 N durante 1 hora.
4. **Hidrólisis ácida**, por calentamiento a reflujo con HCl 1 N durante 1 hora.

5. **Fotólisis,** por exposición de la droga pura y de una solución de la misma a luz UV de onda corta y a la luz solar directa o indirecta.
6. **Oxidación,** por calentamiento en baño maría de una solución de la droga con gotas de agua oxigenada o por burbujeo de oxígeno.

De ser necesario se neutraliza la droga degradada artificialmente (para evitar el maltrato columnas y equipos) y se analiza por el método propuesto. En general se recomienda que la degradación no sea mayor del 20 % de la concentración inicial, de modo que puede ser conveniente repetir alguno de los ensayos empleando condiciones mas suaves o bien más enérgicas. La figura 12.1. muestra un ejemplo de este procedimiento.
Este análisis debe completarse con el estudio de la ***pureza*** u ***homogeneidad*** del pico correspondiente al analito. Este estudio consiste en determinar si existe algún producto de descomposición que produzca un pico superpuesto al del analito y que no alcance a evidenciarse. Para esto es conveniente complementar este estudio con un método alternativo (TLC o GLC) y la comparación de resultados, especialmente en cuanto al número y proporción de los componentes de la muestra degradada.
En este tipo de ensayos resulta muy ventajoso el empleo del detector de ordenamiento de fotodiodos, ya que complementa la información convencional con la relativa a la pureza de picos. Este detector tiene la ventaja ***multiplex***, es decir, puede medir la señal no solo a una longitud de onda discreta sino el espectro de absorción completo en tiempo real (centésimas o milésimas de segundo), de modo que a las dimensiones habituales de tiempo y absorbancia, se agrega una tercera, la longitud de onda, permitiendo apreciar detalles que escapan a detectores convencionales. Expresado de otro modo, con un detector convencional se monitorea la separación a una longitud de onda, la estimada como más conveniente. Finalizado el ensayo, la información que pudiera haberse obtenido a otra longitud de onda estará perdida. Con el detector de ordenamiento de fotodiodos se monitorea y almacena (en un soporte magnético) la información relativa a todo el espectro de absorción, de modo que esa información puede ser posteriormente recuperada y manipulada. La gráfica del espectro de absorción de los picos eluídos proporciona una primer aproximación de identidad, pero existen otros métodos más elaborados que proporcionan mayor seguridad para el desarrollo de métodos y el estudio de pureza de pico: superposición de espectros, isogramas, relación de absorbancias, topogramas, etc, todos ellos ampliamente documentados en la literatura[8] y cuyo análisis detallado escapa al alcance de este libro. Por ejemplo, la figura 12.2 compara los cromatogramas del estándar y producto de oxidación de la figura 12.1 (a) y (e). Este gráfico corresponde a los isogramas (líneas de isoabsorción en un diagrama bidimensional λ vs tiempo) e indica la formación de un producto de degradación cuyo máximo de absorción está en 288 nm y que no puede apreciarse a la longitud de onda tomada para el monitoreo inicial (200 nm). Así, el cromatograma medido a 288 nm es claramente diferente al mismo cromatograma medido a 200 nm, a pesar de que podríamos haber pensado con lógica que 200 nm es una longitud de onda muy apropiada para medir practicamente "toda especie presente" (véase figura 12.3).

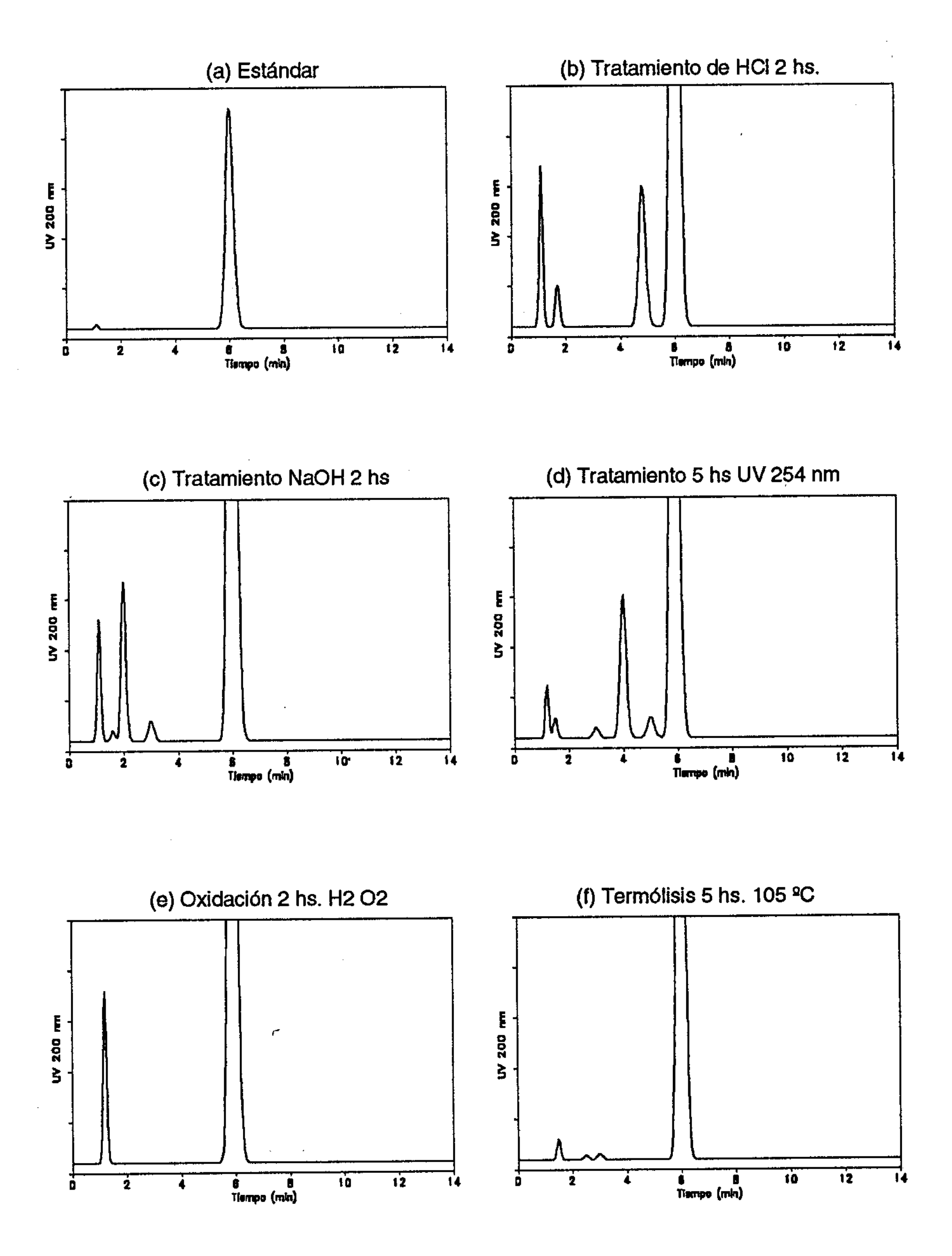


Fig. 12.1. Degradación artificial de la base nitrogenada A-351 por el esquema propuesto (ver texto). Columna: Superspher RP-18, con buffer fosfatos-metanol (40:60), TEA 30 mM, pH 3.0 a 1.0 ml/min.

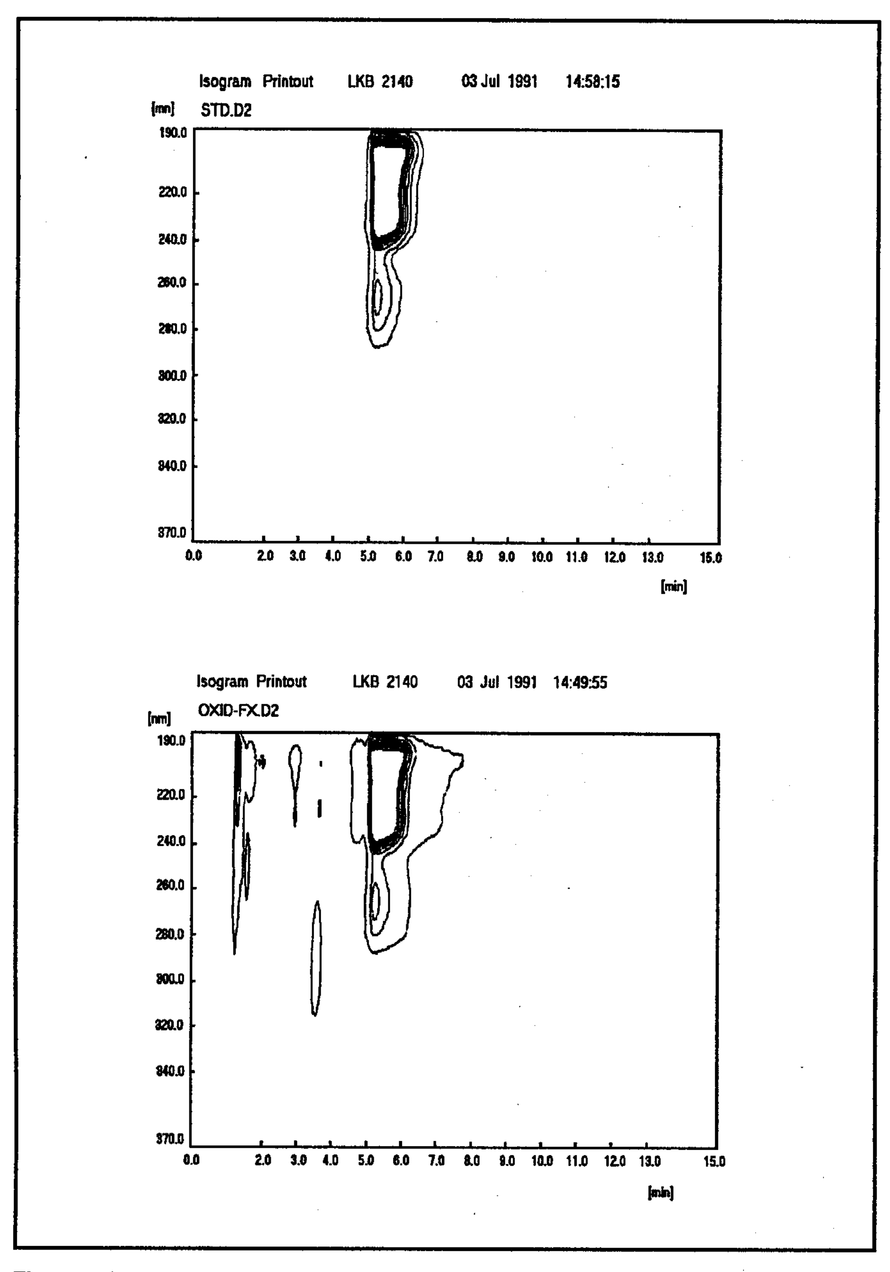


Fig. 12.2. Cromatogramas de isoabsorción del estándar (gráfico superior) y producto de oxidación (gráfico inferior) de la figura 12.1 (a) y (e). Puede apreciarse la formación de un producto con máximo a 288 nm.

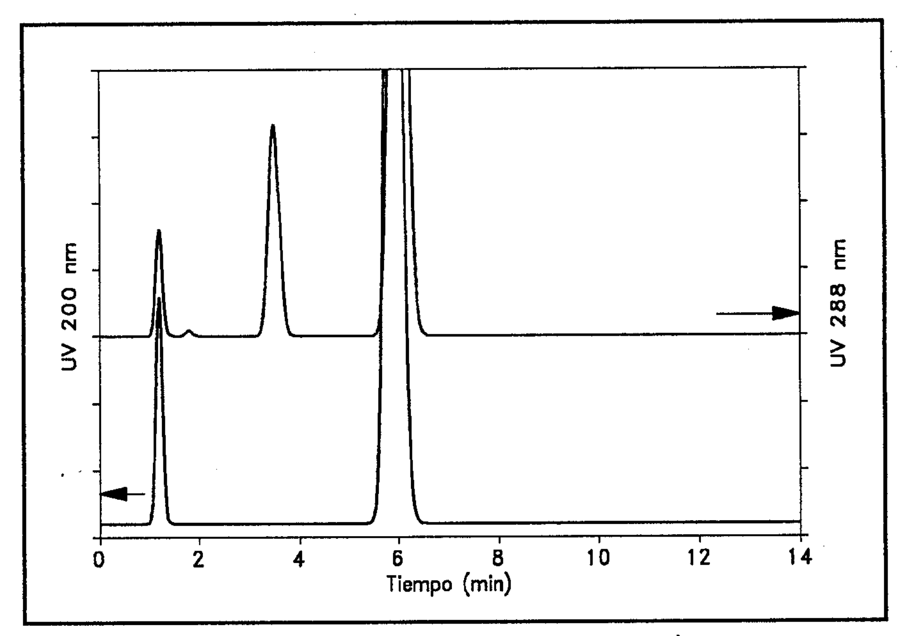


Fig. 12.3. Cromatogramas a 200 (inferior) y a 288 nm (superior) del producto de oxidación de la figura 12.1. Observese la presencia de una banda a 3.5 min, inadvertida a 200 nm.

Un gráfico típico del detector de ordenamiento de fotodiodos es el topograma, en el cual se representan en forma tridimensional los parámetros tiempo, longitud de onda y absorbancia. Esta representación proporciona una imagen visual muy elegante, aunque su análisis es más difícil y probablemente no aporta datos adicionales al isograma. La figura 12.4 muestra el topograma de la figura 12.1 (e), que puede ser ampliado o reducido a voluntad. También puede ser rotado en cualquiera de sus ejes para facilitar la visualización de bandas ocultas por otras bandas mayores, trazado con mayor o menor densidad de curvas, puntos, colores, etc.

Uno de los criterios de pureza más difundidos consiste en la superposición de los espectros de absorción de los segmentos creciente, vértice y decreciente del pico en estudio. En general, estos espectros se grafican "normalizados", es decir, corregidos en su escala de modo que ocupen la misma proporción de la imagen visual. Muchos paquetes de software permiten además el cálculo de la correlación entre curvas espectrales, de modo de cuantificar el grado de similitud espectral. La figura 12.5 muestra un ejemplo de coelución, demostrable por la mala superposición de estos espectros de absorción.

Por otra parte, es posible la comparación del o de los espectros obtenidos en la muestra con bibliotecas (archivos en soporte magnético) en las cuales se pueden almacenarse los espectros de absorción de los estándares puros, productos de degradación, intermedia-rios, etc. y el grado de correlación espectral permite, con ciertas limitaciones (tiempos de

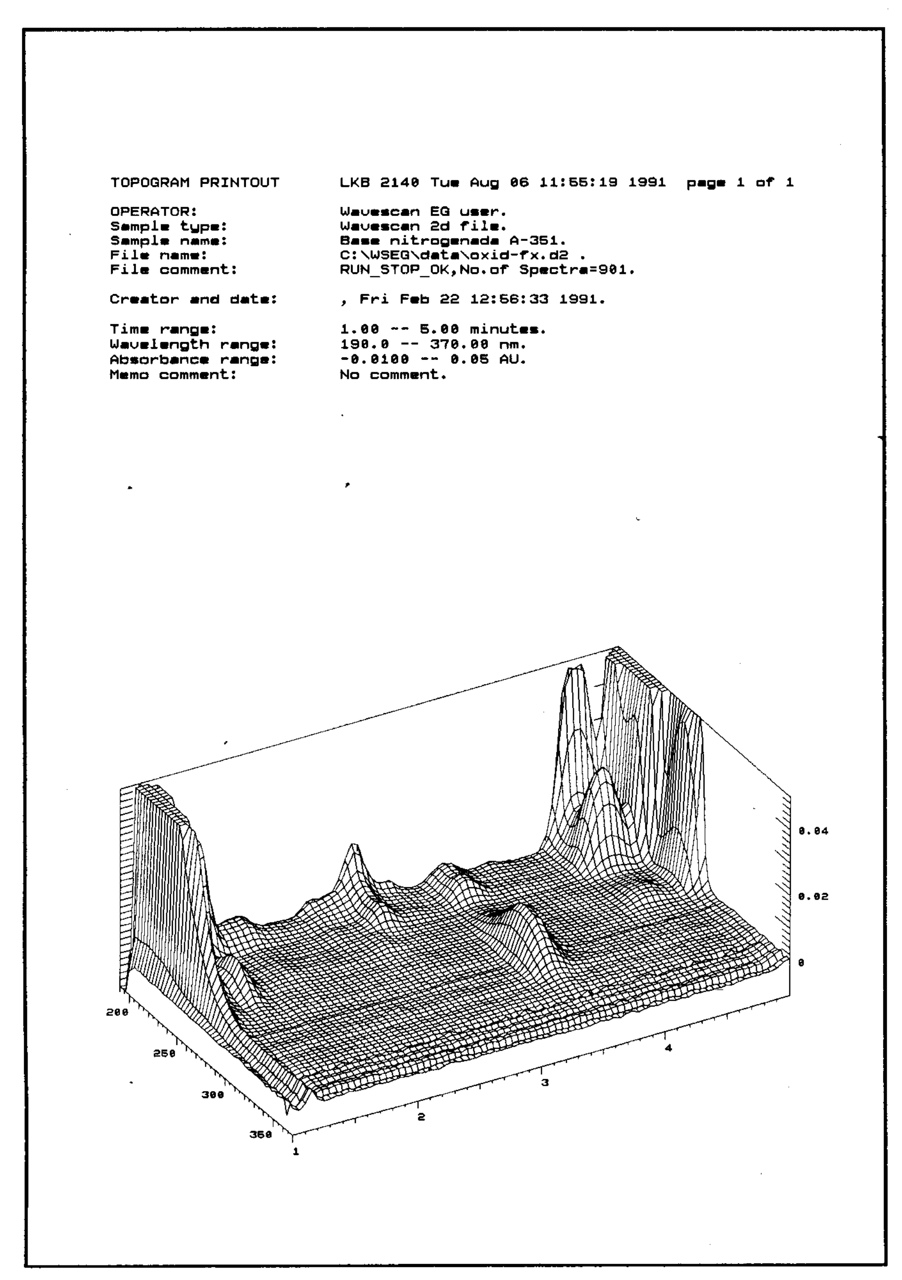


Fig. 12.4. Topograma correspondiente a la figura 12.1e. Este diagrama puede ser expandido o reducido en cualquiera de sus ejes o rotado horizontal y verticalmente para permitir visualizar picos ocultos por otros mayores.

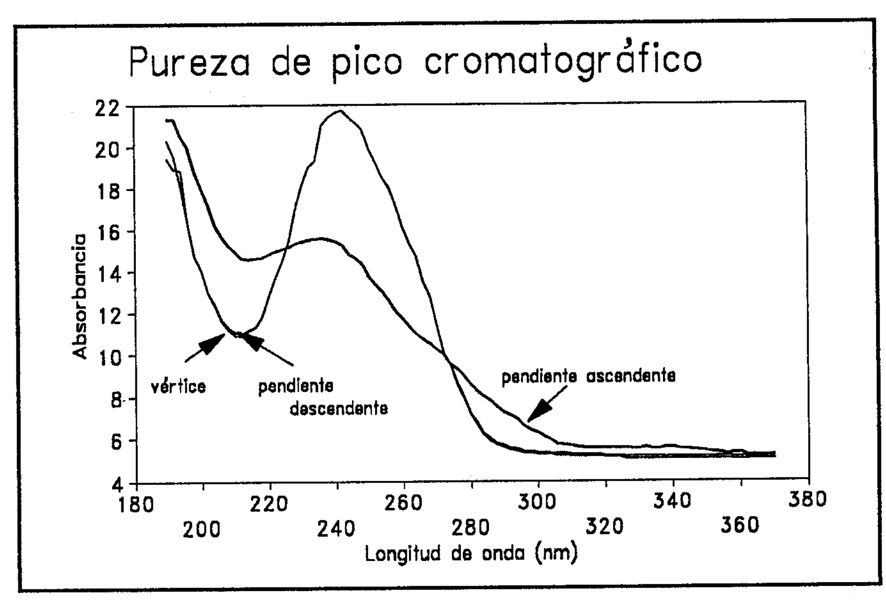


Fig. 12.5. Espectros superpuestos del pico principal obtenido por oxidación. El primero de ellos corresponde evidentemente a un producto de degradación no resuelto en las condiciones establecidas.

retención, influencia del pH sobre el espectro de absorción, etc) asumir o presumir identidad.

La figura 12.6 muestra la aplicación de un software aplicado a un detector de ordenamiento de fotodiodos. Este programa tiene dos módulos:

- El módulo editor permite crear, editar y mantener una biblioteca de espectros UV, obtenidos a partir de cromatogramas de compuestos conocidos o bien producto de reacciones controladas, en determinadas condiciones (composición de fase móvil, pH, etc).
- El módulo de búsqueda compara el espectro UV del compuesto desconocido con los de la biblioteca y ló califica con un factor de correlación que puede estar entre 1.000 (espectros idénticos) y 0.000. Así, un factor 0.990 indica una diferencia espectral del 1%, un factor 0.98 del 2 %, etc.

Los ensayos de degradación artificial descritos permiten no sólo el mejor conocimiento y eventual corrección de la técnica empleada sino que también orientan al desarrollo de nuevas formulaciones de productos, indicando las condiciones de mayor agresividad, las mejor soportadas por la sustancia, condiciones de almacenamiento, tipo de envase, etc. (pH, labilidad a la hidrólisis, fotólísis, oxidación, etc).

En el caso de un producto farmacéutico, deberá considerarse no sólo la inyección de droga

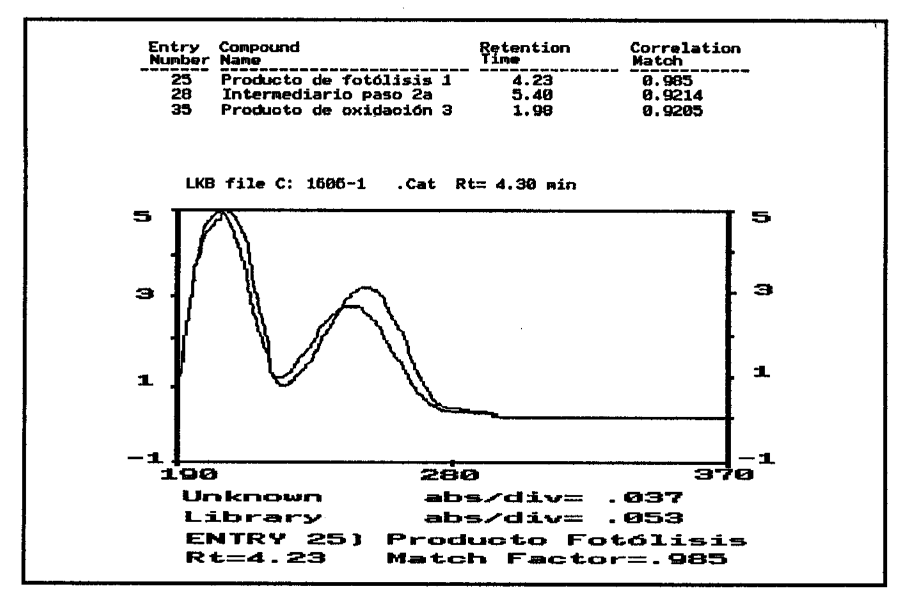


Fig. 12.6. Búsqueda en biblioteca (LKB Spectral Search) del espectro de absorción de un pico cromatográfico obtenido con el detector de ordenamiento de fotodiodos.

y placebo por separado y en conjunto para asegurar la selectividad de la medición, sino también la preparación de un placebo degradado y la degradación del producto final, acondicionada en su envase definitivo. En el caso de una validación retrospectiva pueden en cambio utilizarse productos vencidos o en el límite de su período de vencimiento.

En el estudio de fluídos biológicos o de muestras naturales, donde la complejidad de la matriz dificulta la identificación inequívoca de los picos, deberá recurrirse a otro tipo de métodos para la determinación de la selectividad. Una interesante revisión de las posibilidades, complementada por referencias bibliográficas fue efectuada por Scoble y Brown[9].

En muchos de estos casos, la determinación de la especificidad no puede seguir modelos tan sistemáticos y dependerá del arte e ingenio del analista, pudiéndose tomar como referencias:

1. Tiempo de retención. Sirve como primera base para la identificación del pico, pero ésto a veces no resulta suficiente. En el caso de disponer de estándares, la coinyección de éstos y la comparación cuidadosa de los cromatogramas resultantes (observando la posible aparición de ensanchamiento de bandas, de hombros, si es posible por derivación de la señal -figura 12.7-, etc) puede servir como primera aproximación.
2. La modificación de las condiciones cromatográficas (proporción de solventes o modificadores, pH, etc) y la observación de los resultados complementan el ensayo anterior.

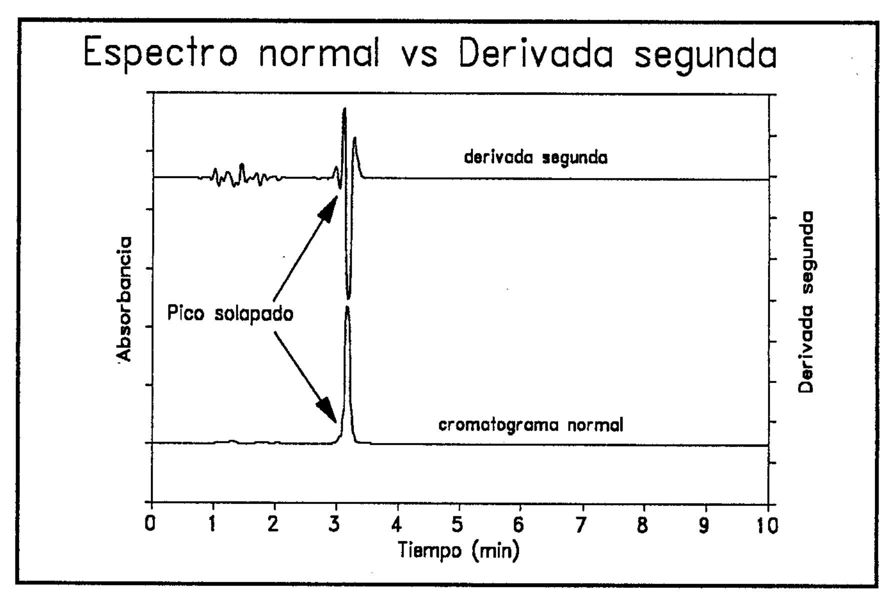


Fig. 12.7. Derivada segunda de un cromatograma mostrando bandas superpuestas. Cada mínimo de la derivada segunda corresponde a un máximo, o a un hombro en el cromatograma, resaltando bandas parcialmente solapadas.

3. La caracterización espectral, por empleo de detectores de ordenamiento de fotodiodos o el barrido espectrofotométrico a caudal detenido o el empleo de cocientes de absorbancia brinda apoyo adicional[12-15].
4. Pueden emplearse detectores de mayor selectividad (y en general mayor sensibilidad), como los de radiactividad, los de fluorescencia (ya sea haciendo uso de la fluorescencia nativa de algunos compuestos o por reacciones de derivatización para la formación de compuestos fluorescentes) o los de detección electroquímica empleados para la oxidación o la reducción. Todos estos detectores permiten suponer la presencia de ciertos grupos funcionales en la molécula del analito.
5. El empleo de técnicas enzimáticas para la transformación del analito, consistentes en la incubación del fluido en presencia de la enzima apropiada, en condiciones adecuadas de temperatura y pH, y la inyección del producto para comprobar la reducción o desaparición del sustrato pueden brindar un gran apoyo, debido a la selectividad propia de la enzima.
6. Las reacciones degradativas (oxidación, reducción, fotólisis, etc) empleadas para comprobar la disminución o desaparición de la señal del analito en el cromatograma pueden apoyar la hipótesis de la presencia de un compuesto con determinados grupos funcionales en el pico a evaluar.
7. Finalmente, existen técnicas complementarias, consistentes en el aislamiento de la

fracción correspondiente al analito y la aplicación de técnicas espectroscópicas o bien sistemas de acoplamiento directo: LC-IR, LC-MS, etc.
Referencias específicas para sistemas cromatográficos y detectores no convencionales son recopiladas bienalmente por Analytical Chemistry[10] y su lectura es recomendada para el analista interesado en estas técnicas concretas.

12.3 Linealidad

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Este paso de la validación es necesario si se va a trabajar con un solo estándar en las determinaciones de rutina, aunque pueden aceptarse métodos no lineales, si se opera con estándares múltiples cada vez. Además, conjuntamente se determina el ***rango lineal***, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación en una curva estándar.
Para su determinación se prepara una serie de al menos cinco diluciones de un estándar, comprendiendo los ámbitos estimados de trabajo con un exceso de al menos 50 % sobre el límite superior y un defecto de 50 % debajo del límite inferior.
Estas soluciones se inyectan al menos por duplicado y se determina la curva de regresión **Y = bX + a** sobre los puntos individuales **sin promediar** por el método de los cuadrados mínimos. Posteriormente se grafica para su documentación.

$$\mathbf{b} = \frac{\Sigma X_i \; Y_i - \dfrac{\Sigma X_i \; \Sigma Y_i}{n}}{\Sigma X^2_i - \dfrac{(\Sigma X_i)^2}{n}} \qquad \mathbf{(12\text{-}1)}$$

$$\mathbf{a} = \frac{\Sigma Y_i - b \; \Sigma X_i}{n} \qquad \mathbf{(12\text{-}2)}$$

Siendo **a** y **b** los estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, **n** el número de mediciones, X_i el la concentración e Y_i el valor medido en el ensayo **i**.
En muchos casos, es interesante comparar los resultados de la recta de regresión obtenida sobre el analito puro, con la correspondiente a analito + matriz (ver figura 12.8). La no correspondencia de las rectas indica problemas por efecto de matriz y está relacionada con

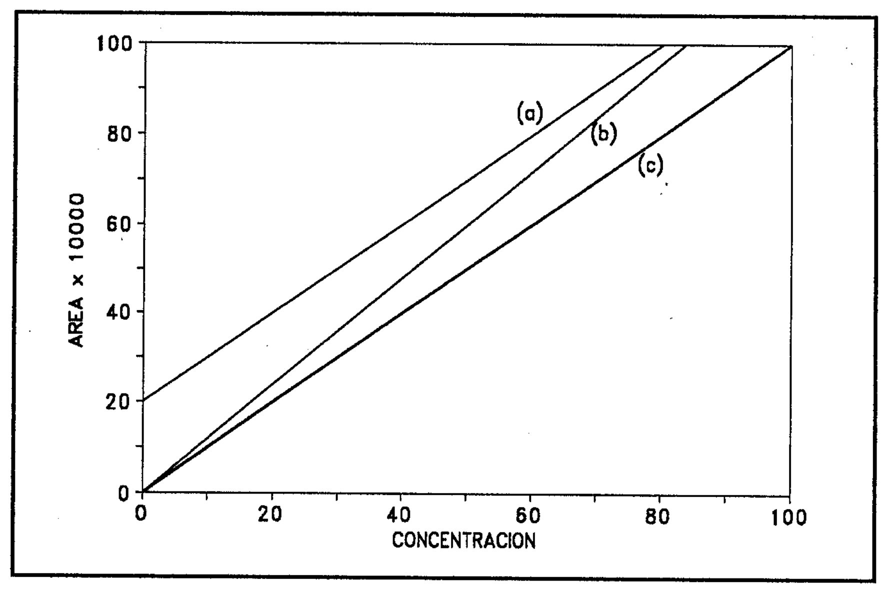


Fig. 12.8. Efectos de matriz, (a) aditivos y (b) multiplicativos, en comparación con (c) el estándar puro.

la exactitud del método en cuestión. Estos efectos de matriz pueden clasificarse de acuerdo a su naturaleza en ***aditivos*** y ***multiplicativos***. Los aditivos se refieren a un desplazamiento positivo del cero en presencia de la matriz y los multiplicativos a un cambio de la pendiente.

Independientemente de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado (por ejemplo, $p=0.05$):

- **del coeficiente de regresión lineal (r)**: se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto, $Y = b\,X + a$.
- **de la pendiente (b)**: se determina como parámetro indicativo de la sensibilidad del método (véase **sensibilidad**) o para evaluar la correlación de diferentes métodos.
- **de la ordenada al origen (a)**: se determina para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse unicamente a un error aleatorio.

Así,

$$\mathbf{r} = \frac{\Sigma X_i \quad Y_i - \dfrac{\Sigma X_i \quad \Sigma Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\Sigma X^2_i - \dfrac{(\Sigma X_i)^2}{n}\right)\left(\Sigma Y^2_i - \dfrac{(\Sigma Y_i)^2}{n}\right)}} \qquad \mathbf{(12\text{-}3)}$$

El valor $r = 1$ indica una recta perfectamente lineal, $r = -1$ una recta perfectamente lineal de pendiente negativa y $r = 0$ la no correlación entre X e Y. En la práctica, r es generalmente mayor de 0.99 y los valores menores de 0.90 son raros. Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal no es **r** sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor de t_r con n-2 grados de libertad y se compara con el valor **t** tabulado para el nivel de confianza requerido.
En este caso, la hipótesis nula es la no correlación entre X e Y. Si el valor observado de t_r es mayor que t_{tabla}, se rechaza la hipótesis, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada (ver ejemplo más adelante):

$$t_r = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1 - r^2)}} \qquad (12\text{-}4)$$

El límite de confianza para el estimador de la pendiente (**b**) se calcula en función de su varianza S_b:

$$S_b = \sqrt{\frac{S^2_{x,y}}{\Sigma X^2_i - \frac{(\Sigma X_i)^2}{n}}} \qquad (12\text{-}5)$$

$$S^2_{x,y} = \frac{\Sigma Y^2_i - a \ \Sigma Y_i - b \ \Sigma X_i \ Y_i}{n - 2} \qquad (12\text{-}6)$$

Luego, los límites de confianza de la pendiente corresponden a:

$$\textbf{Intervalo de confianza de b} = b \pm t \cdot S_b \qquad (12\text{-}7)$$

Por su parte, el límite de confianza del estimador de la ordenada al origen (**a**) se calcula en función de su varianza S_a

$$S_a = \sqrt{S^2_b \ \frac{\Sigma X^2_i}{n}} \qquad (12\text{-}8)$$

$$\textbf{Intervalo de confianza de a} = a \pm t \cdot S_a \qquad (12\text{-}9)$$

Puede también evaluarse el residuo, definido como la diferencia entre la respuesta medida

en cada punto de la curva y la calculada a partir de la ecuación de la curva. El residuo indica el acercamiento al ajuste predicho, siendo sus características ideales

- valor pequeño del residuo
- consistencia de magnitud del residuo
- ausencia de tendencias en su signo (±).

Ejemplo de la determinación de linealidad

Los cálculos efectuados sobre la siguiente curva de calibración, empleando las ecuaciones indicadas, dan los siguientes resultados:

Dato	μg iny. X_i	Area Y_i	$X_i.Y_i$	X_i^2	Y_i^2
1	2.4	2002	4804.8	5.76	4008004
2	5.2	4461	23197.2	27.04	19900521
3	8.0	7033	56264.0	64.00	49463089
4	10.8	9418	101714.4	116.64	88698724
5	13.6	11530	156808.0	184.96	132940900
Σ	40.0	34444	342788.4	398.40	295011238

De los valores de la tabla:

$a = \dfrac{342788.4 - (40 \times 34444)/5}{398.4 - 40^2/5}$ = ... 857.64

$b = \dfrac{34444 - (857.64 \times 40)}{5}$ = ... 27.9

Ecuación de la recta: Y = 857.6 X + 27.9

$r = \dfrac{342788.4 - (40 \times 34444)/5}{((398.4-40^2/5)\ (295011238-34444^2/5))^{½}}$ = ... 0.99938

Grados de libertad: n-2= 3 **t_{tabla}: 3.182**

$t_r = \dfrac{0.99938\ \ (5-2)^{½}}{(1-0.99938^2)^{½}} = 49.16 >> 3.182 =>$ **correlación lineal mejor que p=0.05**

$S_{xy}^2 = \dfrac{295011238 - (27.9)\ 34444 - 857.64 \times 342788.4}{5-2}$ = ... 24972.85

$S_b = (24972.85 / 398.4-40^2/5)^{½}$ = ... 17.85

$b = b \pm t.S_b = 857.64 \pm 2.776 \times 17.85$ = ... (808.1 ; 907.2)

$S_a = (318.53 \times 398.4 / 5)^{½}$............ 159.31

$a = a \pm t.S_a = 27.9 \pm 2.776 \times 159.3$ = ... (-131.4 ; 187.2)

12.4 Precisión

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.
La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, σ, estimada analíticamente por s o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV). El estimador s de la desviación estándar se calcula como:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (X_i - \overline{X})^2}{n - 1}} \qquad (12\text{-}10)$$

donde n es el número de medidas, X_i es el valor medido en el ensayo i y $\overline{X}$ el estimador de la media poblacional μ, calculado como:

$$\overline{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i}{n} \qquad (12\text{-}11)$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$RSD = \frac{s \cdot 100}{\overline{X}} \qquad (12\text{-}12)$$

Ambos estimadores, desviación estándar y desviación estándar relativa permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio, correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media).
En el caso muestras escasas, que no permiten efectuar más de 2 ó 3 determinaciones, la estimación de la desviación estándar sería incierta. En estos casos, puede recurrirse a un "estimador agrupado" [11]: se efectúan mediciones por duplicado o triplicado en diferentes muestras y se calcula la desviación estándar como:

$$s = \sqrt{\frac{1}{N - g} \sum_{j=1}^{g} \sum_{i=1}^{n} (X_i - \overline{X}_j)^2} \qquad (12\text{-}13)$$

Siendo **N** el número total de determinaciones, **g** el número de muestras y **n** el número de determinaciones sobre cada muestra.
En este caso, debe tenerse en cuenta que s varía con la concentración, de modo que, de ser muy diferentes, deberán agruparse por rangos bajo, medio y alto y no deberán

agruparse valores de s muy disímiles.

La precisión de un método analítico deberá estudiarse sobre:

(a) **el sistema**, evaluando la dispersión de al menos 6 inyecciones del estándar.

(b) **el método**, evaluando la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea. La evaluación corresponde a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito por parte del instrumento. Así por ejemplo, resulta necesario considerar la imprecisión causada por las diluciones, un factor frecuentemente olvidado.

En este caso, la precisión debe medirse en condiciones **repetitivas** (mismo analista, mismo día, mismo instrumento) y en condiciones **reproducibles** (diferente analista, diferente día, diferente instrumento). El cociente repetitibilidad/reproducibilidad es un parámetro muy útil para evaluar la precisión de un método analítico. Su valor, según estudios realizados por la AOAC[16] está normalmente comprendido entre 1.5 y 2. Valores mayores de 2 pueden indicar un método "muy personal", mientras un valor menor de 1.5 indica pobre repetitibilidad de algún analista en una serie de mediciones.

El criterio de aceptación puede ser variable y estará dictado por los objetivos buscados. Así, la USP indica en general una RSD del sistema de no más de 2 %, inyectando 5 veces una solución estándar, aunque pueden obtenerse en condiciones apropiadas valores inferiores al 1 % e incluso menores.

Existen tablas que relacionan la RSD máxima aceptable para un método analítico en función de los límites de aceptación y del número de réplicas[2,19] (ver tabla 12.I).

Por ejemplo, para un intervalo de aceptación de 95-105 %, para efectuar una determinación por duplicado, la RSD deberá ser menor de 2.7 %.

Por otra parte, la magnitud porcentual o la masa relativa del analito y la complejidad de la matriz resulta también de importancia y para el análisis de trazas o para el ensayo de una droga en fluidos biológicos puede no ser posible la precisión indicada, resultando apropiadas RSD de 5 % a 10 % o mayores[17].

Límites de Aceptación	**Simple**		**Duplicado**	
	RSD METODO	**RSD SISTEMA**	**RSD METODO**	**RSD SISTEMA**
98.5 - 101.5	0.6	0.4	0.8	0.6
97 - 103	1.2	0.8	1.6	1.2
95 - 105	1.9	1.4	2.7	1.9
93 - 107	2.7	1.9	3.8	2.7
90 - 110	3.9	2.8	5.5	3.9

Tabla 12.I. Criterios de aceptación.

Horwitz[20] ha encontrado una ecuación empírica que relaciona la RSD de un método dado con la concentración de analito en la muestra. Para ello, se recopilaron resultados de unos 150 ensayos interlaboratorios de la AOAC comprendiendo, por lo menos, 5 metodologías diferentes (cromatografía, absorción atómica, espectrofotometría, bioensayos). La relación hallada es la siguiente:

$$\mathbf{RSD\ (\%)\ =\ 2^{(1-0.5\log C)}} \qquad \mathbf{(12\text{-}14)}$$

Donde C es la concentración del analito expresada en potencias de 10.
Así, si la concentración de analito es 1 ppm (10^{-6}), la RSD será:

$RSD = 2^{4} = 16\ \%$

y si la concentración de analito es 1 ppb (10^{-9}), la RSD será:

$RSD = 2^{5.5} = 45\ \%$

En el mismo trabajo, Horwitz reportó que la RSD entre laboratorios tiende a disminuir al aumentar la experiencia analítica hasta un valor mínimo que se aproxima bastante al estimado por cálculo.

Límites de confianza

En muchos casos debe indicarse el intervalo de confianza de la medida, es decir, el rango en el cual puede definirse la probabilidad de que éste "capture" con la probabilidad indicada el parámetro μ.
Los criterios pueden ser varios, pero deberá dejarse constancia del empleado: la media ± 2 desviaciones estándar (correspondiente al 95 % de las medidas en una distribución normal o gaussiana), la media ± 3 desviaciones estándar (99,7 % de las medidas para el mismo tipo de distribución) o preferentemente, cuando el número de muestras es pequeño (menor de 30), las medidas independientes, y la distribución normal, puede calcularse de acuerdo a la distribución t de Student según

$$\bar{X} - \frac{t_{\upsilon,\alpha} \cdot S}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + \frac{t_{\upsilon,\alpha} \cdot S}{\sqrt{n}} \qquad \mathbf{(12\text{-}15)}$$

Donde $t_{\upsilon,\alpha}$ es el valor "t de Student", tabulado para n mediciones con $\nu = n-1$ grados de libertad y para varios niveles α de significación (el nivel más empleado es p:0.05, correspondiente a un intervalo de confianza del 95 %).

Ejemplo de la determinación de Precisión

Dato	Conc.%	Dato	Conc.%
1	49.75	4	49.85
2	49.60	5	50.05
3	49.95	6	50.20

Número de datos (n): 6
Media $\overline{X}$: 49.90
Desviación estándar (s): 0.21
RSD: .... 0.43 %
Intervalo de confianza del 95 % de la media: .... (49.7;50.1)

Siendo t=2.571 para 6-1=5 grados de libertad a una significación del 95 % (p=0.05). Estos cálculos pueden ser fácilmente realizados por medio de una microcomputadora con un sencillo programa BASIC, por medio de programas comerciales o bien con una calculadora de bolsillo con funciones estadísticas. En este último caso, debe tenerse en cuenta el número de cifras significativas que la calculadora puede aceptar (4 en algunos modelos) y efectuar las correcciones correspondientes, ya que el desconocimiento de este factor puede llevar a serios errores[18].

12.5 Exactitud

La exactitud de un método , también conocida como **error sistemático** o **tendencia**, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. Matemáticamente, suele expresarse de los siguientes modos

Desviación: $$B = \overline{X} - \hat{X} \qquad (12\text{-}16)$$

Desviación Relativa: $$B\% = \frac{B}{\overline{X}} \cdot 100 \qquad (12\text{-}17)$$

Recuperación: $$R = \frac{\overline{X}}{\hat{X}} \cdot 100 \qquad (12\text{-}18)$$

Donde $\overline{X}$ es el valor medio y $\hat{X}$ el valor verdadero.
De todas ellas, la más utilizada es, sin lugar a dudas, la recuperación. Si bien el valor verdadero de concentración no se conoce sino que sólo puede estimarse, es posible preparar una muestra por un procedimiento más exacto que el evaluado (por pesada, dilución en peso, etc) y utilizarla como referencia.

De hecho, la norma ASTM 456-83, al referirse a la exactitud de un método analítico habla de la concordancia entre el valor medido y el valor aceptado como referencia. De esta manera, es posible independizarse del término "valor verdadero" usado en estadística cuyo significado es diferente.
La exactitud o bien podríamos llamarla "inexactitud", debe ser tan pequeña como sea posible para que el valor medido se aproxime al de referencia. Dicho de otro modo, la recuperación del analito debe acercarse al 100 %.
En el análisis de trazas (microcomponentes), no siempre se alcanzan recuperaciones tan elevadas y se consideran habituales[20] valores de recuperación entre el 60 y 80 %.
En el análisis de macrocomponentes, en general se requiere que el valor medido no difiera significativamente del aceptado como referencia. Para determinarlo puede utilizarse un ensayo t de Student, efectuando varias determinaciones de la muestra de concentración conocida y calculando el t experimental, t_{ob}, que se compara con el t de tablas para n-1 grados de libertad en el nivel de confianza escogido, generalmente p=0.05. El valor t_{ob} puede calcularse como

$$t_{ob} = \frac{[\hat{X} - \overline{X}]}{S \sqrt{n}} \qquad (12\text{-}19)$$

Si t_{ob} resulta menor que el valor tabulado, el método tiene la exactitud requerida para ese ámbito de confianza.
Si t_{ob} resulta mayor que el valor tabulado, el método tiene un error sistemático, del signo resultante, para ese ámbito de confianza.
Otro diseño habitual emplea, al menos, 3 concentraciones del analito, preparadas por triplicado, comprendidas dentro del rango de linealidad del sistema: en general se estudian concentraciones correspondientes al 50-80, 100 y 120-150 % del valor esperado (ver ejemplo más adelante).
En este caso, el valor t se calcula como:

$$t_{ob} = \frac{[100 - R]}{RSD \,.\, \sqrt{n}} \qquad (12\text{-}20)$$

Siendo R la recuperación porcentual.
Los valores t_{ob} se comparan con los tabulados para el intervalo de confianza requerido con n-1 grados de libertad y la exactitud o inexactitud se evalúan para el promedio de recuperaciones de todas las concentraciones. Si $t_{ob} < t_{tabla}$, no existe diferencia significativa con el 100 % de recuperación y la exactitud es apropiada.
Por otra parte, resulta conveniente graficar masa hallada vs masa agregada, rectificando por el método de los cuadrados mínimos. La pendiente deberá ser unitaria y la ordenada al origen deberá pasar por cero (estimando los parámetros de regresión, en general con p=0.05).
Una pendiente significativamente diferente de 1 indica un error proporcional, por

ejemplo, debida a la extracción de un porcentaje constante del componente.
Una ordenada al origen significativamente diferente de cero indica un error de tendencia constante y se visualiza como una recta paralela a la teórica, en la cual el valor de la ordenada al origen corresponde a la magnitud del error.

Ejemplo de la determinación de Exactitud

En este caso, se preparan tres muestras con el 80, 100 y 120 % de la concentración estimada del analito y se analiza cada una por triplicado.

% AGREGADO	% HALLADO			% RECUPERACION		
80	78.5	78.3	76.0	98.1	97.9	95.0
100	101.1	101.3	98.4	101.1	101.3	98.4
120	119.2	119.5	118.8	99.3	99.6	99.0
				R (n=9):		98.9 %
				S:		1.88
				RSD:		1.90

En este caso, la recuperación media (R) para n = 9 medidas es 98.9%, $t_{tablas}(\upsilon{:}8;\alpha{:}0.05)=2.306$ y t_{ob} se calcula como:

$$t_{ob} = \frac{|100 - R| \ \sqrt{n}}{RSD} = \frac{(100 - 98.9) \ \ 3}{1.90} = 1.74$$

Como $t_{ob} < t_{tablas}$ (1.74 < 2.036), no existen diferencias significativas entre recuperación media y 100. El mismo cálculo puede efectuarse para las series individuales.
Los parámetros de la recta son

Ecuación de la recta .... Y = 1.039 X - 4.91
Int. confianza del 95 % de la pendiente .... (0.96 ; 1.11)
Int. confianza del 95 % de la ordenada al origen .... (-12.2 ; 3.3)

Es decir, pendiente y ordenada al origen incluyen a la unidad y a cero respectivamente con una probabilidad del 95 %.

12.6 Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Se debe diferenciar claramente entre dos tipos

de sensibilidad:

a. **Sensibilidad de calibración**, correspondiente a la pendiente de la curva de calibración.
b. **Sensibilidad analítica**, correspondiente al cociente entre la sensibilidad de calibración y la desviación estándar de la medida.

Resulta claro que dos técnicas o la misma técnica empleada para diferentes matrices, pueden tener la misma sensibilidad de calibración, pero diferente sensibilidad analítica debida a factores propios como necesidad de extracción, concentración, etc.
Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y de cuantificación.

- **Límite de detección** corresponde, según la USP XXII, a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (%, ppm, ppb, etc). Su determinación puede efectuarse por comparación con la respuesta de un blanco o placebo, siendo positiva cuando la señal supere la relación señal/ruido en un factor de 2 o 3 (según el criterio del analista).
- **Límite de cuantificación** corresponde, según la misma referencia, a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración. En este caso, generalmente se mide la señal de fondo (relación señal/ruido), efectuando mediciones repetidas sobre un blanco o placebo, se mide su desviación estándar y se calcula el límite de cuantificación multiplicando esa desviación estándar por un factor, generalmente igual a 10. El valor resultante se valida por análisis de un número variable de muestras de concentración cercana al límite fijado.

Dado que la determinación de los límites de detección y cuantificación supone un trabajo importante, en general sólo de efectúa para el análisis de impurezas o trazas o cuando el rango analítico se encuentra muy próximo al límite de detección. En caso contrario, sólo se estudia la precisión y exactitud en la menor concentración probable para el analito.
Los límites de detección y cuantificación también pueden estimarse a partir de la curva de regresión, siempre que se hayan considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero (ver ejemplo más adelante):

1. Se determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado: **b**.

2. Se obtiene otra curva de calibración, inyectando cada punto por triplicado, pero en este caso para concentraciones menores de analito, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: $\mathbf{Y_{bl}}$.

3. Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración del punto 2, se calcula la recta correspondiente a concentración vs s y se extrapola como en el

caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado S_{bl}, correspondiente a la desviación estándar del blanco.

Se calcula el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco) para **n'** medidas individuales como

$$\textbf{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3\ S_{bl}}{b} \quad \frac{1}{\sqrt{n'}} \qquad (12\text{-}21)$$

$$\textbf{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10\ S_{bl}}{b} \quad \frac{1}{\sqrt{n'}} \qquad (12\text{-}22)$$

Otros métodos para la determinación de los límites de detección y de cuantificación se encuentran recopilados en bibliografía[21].

Ejemplo de determinación de límites de detección y de cuantificación

Tomando la curva de calibración del ejemplo anterior, representada por la ecuación Y = 857.6 X +27.9 y calculada entre 2.4 y 13.6 g de masa inyectada, se efectúan tres mediciones por triplicado en la zona inferior de la curva para el cálculo de los límites de detección y de cuantificación.

µg iny.	Area			Area media	s	RSD
0.25	242	254	230	242.0	12.00	9.46
0.50	460	465	447	457.3	9.29	2.03
0.75	671	667	679	672.3	6.11	0.91

1. Cálculo de respuesta a concentración cero:

El análisis de regresión tomando los valores medios de área da la recta **Y = 860.6 X + 26.9**

La estimación de la respuesta a concentración cero es Y_{bl}= 26.9

2. Calculo de la desviación estándar de la respuesta a concentración cero:

Se efectúa el análisis de regresión tomando concentración como X y desviación estándar como Y.

X (g)	s
0.25	12.0
0.50	9.29
0.75	6.11

La recta calculada es

Y = -11.78 X + 15

Y se toma s_{bl}= 15

Luego, tomando como pendiente b: 857,6 los índices a calcular son:

Límite de detección = (26.9 + 3 x 15) / 857.6 = 0.08 µg

Límite de cuantificación = (26.9 + 10 x 15) / 857.6 = 0.21 µg

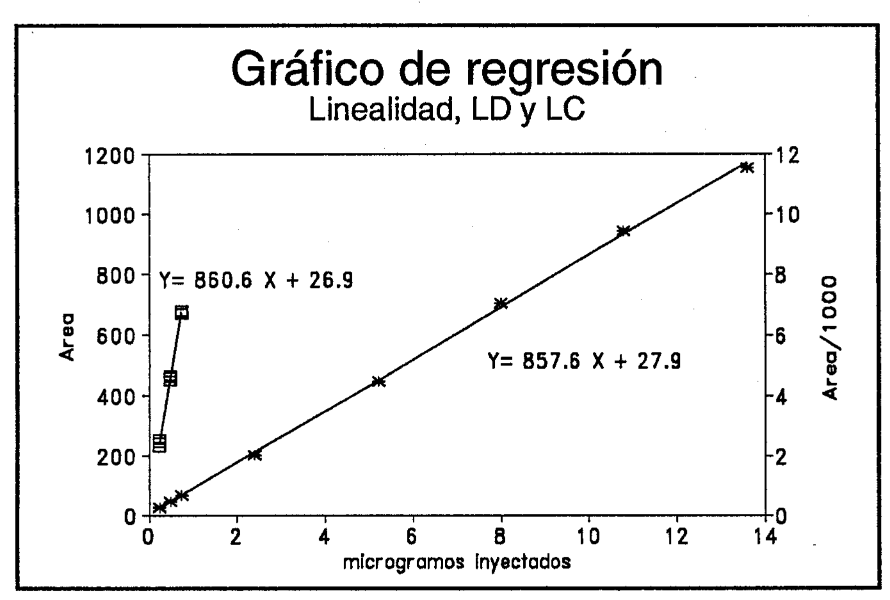


Fig. 12.9. Curva de regresión del ejemplo en dos niveles, correspondientes al empleado para el cálculo preciso de la pendiente, y el cercano a cero para determinar los límites de detección y de cuantificación.

12.7 Robustez

La robustez de un método analítico corresponde a los estudios que indican el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios de variables comunes[23]. Estos cambios pueden ser ligeras diferencias operativas, de equipos, analistas, laboratorios, fuente de columnas, etc. Frecuentemente este estudio se realiza retrospectivamente, a partir de los resultados históricos obtenidos en diferentes condiciones, pero en el caso de métodos nuevos, es conveniente que el estudio sea efectuado por el laboratorio emisor de la técnica.
Es evidente que un método debe ser "robusto" (reproducible) frente a cambios de analistas o instrumentos, pero no necesariamente debe serlo frente a **todos** los cambios que se estudien. Así, es de esperar que la modificación de algún factor, por ejemplo el pH de la fase móvil, produzca en algún caso cambios drásticos en la separación. En este caso, se intentará trabajar con un valor de pH tal que una ligera modificación no produzca cambios importantes. Si esto no es posible, se informará dentro del texto del método en cuestión que el valor de pH de la fase móvil es crítico para la separación, indicando el rango en el cual es posible variarlo sin producir alteraciones en los resultados.
En contrapartida, cuando algún factor no resulte crítico para la separación (típicamente

el contenido de modificador orgánico de la fase móvil), es posible indicar dentro del texto del método que su proporción puede modificarse para asegurar la separación deseada.
En HPLC deberá estudiarse la eventual variación de resultados (precisión, resolución, eficiencia, asimetría, etc) ante cambios de variables tales como columna (fuente, tipo de partículas, longitud, número de inyecciones), cambios de pH, de temperatura, de composición de la fase móvil, etc, así como el intervalo entre la preparación de la solución a inyectar y la inyección misma.
En la selección de las variables a considerar debe utilizarse todo el conocimiento ya adquirido durante el desarrollo analítico para minimizar el número de ensayos a realizar.
En un diseño normal de "una variable por vez", el estudio de 5 variables resultaría en 2^5=32 ensayos. Por eso, cuando los factores a evaluar en el estudio de robustez son muchos, se recurre a un diseño global que permite agruparlos, reduciendo el número de ensayos a efectuar.
Un diseño muy utilizado es el de Placket y Burman[22,23], que permite estudiar el efecto de **n** variables en **n+1** ensayos. En la tabla 12.II se ejemplifica el estudio de 7 variables en 8 ensayos. Las variables seleccionadas se indican con letras: las letras mayúsculas (A, B, C, D, E, F) corresponden al nivel alto y las letras minúsculas (a, b, c, d, e, f) al nivel bajo de la variable en cuestión. Luego se selecciona uno o más parámetros a medir y se obtienen los resultados indicados con las letras s, t, u, v, w, x, y, z. Estos resultados corresponden a uno o más parámetros en estudio: concentración hallada, resolución, asimetría, etc.

Factor/Ensayo	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	**s**	**t**	**u**	**v**	**w**	**x**	**y**	**z**

Tabla II. Diseño experimental para 7 variables en un estudio de robustez según Placket y Burman[22,23].

Parámetros	Diferencia
A-a	$V_A = ¼ (s+t+u+w) - ¼ (w+x+y+z)$
B-b	$V_B = ¼ (s+t+w+x) - ¼ (u+v+y+z)$
C-c	$V_C = ¼ (s+u+w+y) - ¼ (t+v+x+z)$
D-d	$V_D = ¼ (s+t+y+z) - ¼ (u+v+w+x)$
E-e	$V_E = ¼ (s+u+x+z) - ¼ (t+v+w+y)$
F-f	$V_F = ¼ (s+v+w+z) - ¼ (t+u+x+y)$
G-g	$V_G = ¼ (s+v+x+y) - ¼ (t+u+w+z)$

Tabla 12.IV. Cálculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro.

Finalmente, se calcula la diferencias de medias para cada parámetro en forma individual como está indicado en la tabla 12.IV.
Para decidir si un parámetro tiene influencia significativa sobre el resultado, se compara la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de s (desviación estándar del estudio de precisión) y raíz de 2. Por ejemplo,

$$\textbf{Si } |V_B| > s\sqrt{2} \Rightarrow \textbf{diferencia significativa}$$

Ejemplo del estudio de robustez en una valoración por HPLC

Variable	Nivel bajo	Nivel alto
Columna	6 cm, 3 µm dp	15 cm, 5 µm dp
pH	3.0	5.0
Caudal	1.00 ml/min	2.00 ml/min
Temperatura del horno	30°C	50°C
Concentración de Trietilamina	30 mM	60 mM
Concentración de MeOH	50 %	60 %
Tiempo preparación-inyección	30 minutos	8 hs

Es decir, puede estudiarse el efecto producido al cambiar una columna de 6 cm de longitud y 3 µm de diámetro de partícula por una columna de 15 cm y 5 µm (en este caso se intenta estudiar solo una variable, la eficiencia -N-, que puede suponerse a priori aproximadamente igual en una columna corta de diámetro de partícula pequeño y en una más larga, de mayor diámetro de partícula), por variación de 2 unidades de pH de la fase móvil, de la concentración de un modificador de fase móvil, etc, sobre los resultados obtenidos: concentración hallada, resolución, asimetría, etc.

Referencias

1. USP XXII <1225> Validation of Compendial Methods.
2. "Validación de Métodos Analíticos", Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Sección Catalana, setiembre de 1989.
3. Kateman G, Pijpers F., "Quality Control in Analytical Chemistry", J. Wiley & Sons, N.Y., 1981.
4. Long G., Winefordner J., Anal. Chem. 55(7), 712A, (1983).
5. "Praxis der Validierung", Sucker Edwyg (1983).
6. Miller J. C., Miller J. N., "Statistics for Analytical Chemistry", Ellis Horwood Ltd.- John Wiley & Sons, Chichester, 1986.
7. Remington R, Schork M., "Estadística Biométrica y sanitaria", PHI, Madrid, 1974.
8. Hoshino, J. Chromatogr. 316, 473, (1984).
9. Scoble H., Brown P., "High-Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives", volumen 3, cap. 1, Csaba Horváth, Academic Press, N.Y., 1983.
10. Analytical Chemistry, Fundamental Reviews, American Chemical Society, Washington D.C.
11. Nonzioli A. C., SAFYBI **18**(50), 1281, (1978).
12. Drouen A., Billiet H.; De Galan L., Anal. Chem. 57, 962, (1985).
13. Shieffer G., J. Chromatogr. 319, 387, (1985).
14. Drouen A., Billiet H., De Galan L., Anal. Chem. 56, 971, (1984).
15. Carter G., Schiesswohl R., Burke H., Yang R., J. Pharm. Sci. 71(3), 317, (1982).
16. Horwitz, Anal. Chem. 54(1), 67A, (1982).
17. Koltoff I.M., Sandell E.B., Meechan E.J., Bruckenstein S., "Análisis Químico Cuantitativo", 4ta. ed., Ed. Nigar, Buenos Aires, 1975.
18. Wanek P. y col., Anal. Chem. **54**, 1877, (1982).
19. Debesis E. y col., Pharm. Tech. 120, 137, (set. 1982).
20. Horwitz W., Anal. Chem. 54(1), 67A, (1982).
21. Garcés J., CIF 7(182), 217, (1988).
22. Connors K.A., Amidon G.Ll, Stella B.J., "Chemical Stability of Pharmaceuticals", cap. 7, 2da. ed., J. Willey, N.Y., 1986.
23. Youden, "Statistical Manual of the AOAC", AOAC, 1975.

Capítulo 13

Resolución de Problemas

13.1 Introducción

"La mejor manera de resolver los problemas, es no tener que hacerlo"[1]

En los últimos años la HPLC se ha transformado en una de las metodologías analíticas más ampliamente utilizadas en el análisis de sustancias orgánicas. Por la rapidez con la cual se obtienen resultados cuantitativos se la emplea tanto en los análisis de muestras de rutina como en el seguimiento de procesos de líneas de producción. Si bien todas las aplicaciones son igualmente importantes en cuanto al valor de sus resultados, en las dos últimas cualquier retraso en la entrega de resultados desde el laboratorio analítico representa un problema adicional: la interrupción del proceso productivo.
La resolución de los problemas (troubleshooting) fue definida por Merrill[2] como "la identificación de un problema que ocurre durante un proceso dado y su resolución con la menor interrupción posible, la palabra clave es la interrupción".
Los equipos de HPLC sufren, desafortunadamente, un desgaste mecánico importante debido a las altas presiones con las cuales operan por lo cual necesitan mantenimientos mayores que los requeridos por los equipos habituales de un laboratorio analítico. Es necesario, entonces, que el analista se encuentre familiarizado tanto con la metodología de mantenimiento preventivo de los instrumentos como con los procedimientos para resolver los problemas habituales. En este capítulo intentaremos dar una guía somera para iniciar al lector en estos temas. Para profundizarlos es posible recurrir a la literatura[1-5].
De todas maneras cuando se presenta un problema instrumental, la primer fuente de consulta debe ser el manual provisto por el fabricante ya que no siempre puede correlacionarse la dupla síntoma-falla de modo general y a que es justamente el fabricante es el que mejor conoce el instrumento por ser el responsable de su diseño y elaboración.
Desafortunadamente muchos analistas recién recuerdan la existencia de esos manuales cuando los problemas se presentan y no consideran que la prevención siempre ayuda a evitarlos.

13.2 Guías para resolver problemas

Existen básicamente dos modalidades para encarar la resolución de los problemas. La primera consiste en esperar que el problema se presente para tratar de resolverlo y la segunda en ejecutar un adecuado mantenimiento a los efectos de evitarlo. Si bien las dos

modalidades pueden resultar válidas, en una línea de producción muchas veces no se puede esperar que el analista cambie los sellos de una bomba para tener los resultados de un análisis. En ese caso resulta conveniente ejecutar un mantenimiento preventivo y cambiar los sellos, por ejemplo, cada 3 meses. Esta situación es válida tanto para los sellos de la bomba como rotores o sellos del inyector que se deterioran necesariamente con el uso por lo cual es posible reemplazarlos regularmente. Sin embargo, debe considerarse que ciertos problemas no pueden prevenirse. Por ejemplo, fallas en los circuitos impresos no pueden preverse, por lo cual en ese caso debe esperarse a que el problema se presente. En todo caso, si una línea de producción depende de un resultado cromatográfico, no resulta razonable depender de un sólo equipo y debe considerarse un segundo instrumento ya sea de funcionamiento paralelo o como reserva.
Una tercer alternativa igualmente válida para resolver problemas, consiste en vigilar atentamente el estado de los cabezales de las bombas y cambiar los sellos en cuanto se observe alguna pérdida de líquido (en este caso el desperfecto no se evita pero el analista se anticipa al problema).
El objetivo de la resolución de un problema consiste en identificar la falla, aislarla y corregirla tan pronto como sea posible. Para este propósito hemos tratado de condensar nuestra experiencia en varias tablas (13.I a 13.IV) que pueden consultarse de acuerdo al síntoma observado. Por ejemplo si se observan pérdidas de solvente:

- Se verifica la pérdida de solvente (identificar la falla)
- Se busca el componente responsable de la pérdida (aislar la falla)
- Y por último se intenta resolver el problema (corregir la falla)

Para facilitar la búsqueda de la solución posible pueden consultarse las tablas anteriormente mencionadas a partir del síntoma observado, (en el ejemplo:5). En la columna siguiente se encuentran las posibles causas de ese problema y en la última las posibles soluciones. En el ejemplo existen 8 causas probables que pueden generar ese síntoma, y, por ende, 8 soluciones. Para encararlo se lo debe analizar adecuadamente descartando una a una las causas listadas. Por ejemplo, si se verifica que las uniones no pierden la causa a) puede descartarse y pasar a la causa b). Estas tablas se han construido separando arbitrariamente los temas en problemas instrumentales (pérdidas, anormalidades en la presión y otros) y problemas inherentes a la separación en sí misma (problemas cromatográficos). En este capítulo no nos ocuparemos de los problemas relacionados con la cuantificación debido a que han sido detallados extensamente en el capítulo 10 y no se reiterarán.
Es conveniente, además, tener puntos de referencia para decidir si el sistema está operando adecuadamente. Así, si se observa alta presión de trabajo se debe dilucidar si esta presión se debe al empleo de fases móviles de elevada viscosidad (en cuyo caso una elevada presión de trabajo es normal) o si existe verdaderamente una falla en el sistema. Para ello es conveniente tener un registro de las presiones de las diferentes columnas en los diferentes solventes. Estos puntos de referencia pueden utilizarse cuando las fallas

aparecen, pero también, a los efectos de "anticiparse a los problemas" es conveniente utilizarlos durante los controles periódicos de los instrumentos. En este capítulo, en cada una de las partes que tratan de los temas particulares, daremos una guía para establecer esas condiciones de referencia.

Reglas básicas

"A veces cambios lógicos producen resultados inesperados"[6]

Si bien esta frase puede resultar cierta en algunos casos, en la mayoría de ellos aplicando la lógica y el sentido común todos los problemas pueden resolverse. Dolan y Snyder[1] propusieron 6 reglas básicas que hacen a las buenas prácticas para la resolución de los problemas, éstas son:

Regla 1: **Modifique un sólo factor por vez.** La modificación de varios factores al mismo tiempo puede resolver un problema pero el operador jamás sabrá cuál era el factor que presentaba la falla para prevenirlo en el futuro.

Regla 2: **Asegúrese de que el problema exista.** Esta regla se refiere a la confirmación del problema antes de tomar ninguna acción sobre él. Supongamos, por ejemplo, que una deriva marcada de la línea de base hace suponer que el solvente que se está utilizando no es lo suficientemente puro. Antes de cambiarlo sería conveniente asegurarse que la fase móvil se ha equilibrado y que la columna no está eliminando sustancias muy retenidas.

Regla 3: **Sustituya la parte que falla.** La sustitución de la parte que, presumiblemente, está fallando por otra en buen estado es una vía muy rápida para confirmar la fuente del problema. En este aspecto los equipos modulares son superiores a los integrados, ya que en los primeros es posible reemplazar los módulos fácilmente, mientras que en los segundos o bien debe desarmarse todo el instrumento para poder hacerlo, o bien la sustitución es, prácticamente, imposible. Una ventaja adicional de los equipos modulares es que pueden "armarse" con las mejores partes de cada fabricante.

Regla 4: **Vuélvalo a colocar.** Una vez sustituido el componente que presenta la falla, es conveniente volver a colocar el componente anterior para confirmar la presencia del problema. Es decir que la regla "de sustitución" y la regla de "vuélvalo a colocar" operan, habitualmente, juntas. Sin embargo no es conveniente utilizar esta regla en los casos donde los componentes se dañan al sacarlos del equipo cromatográfico, por ejemplo: sellos de bombas o inyectores.

Regla 5: **Escríbalo.** De nada valen las buenas prácticas del mantenimiento preventivo si tanto los cambios que se introducen en el sistema como las observaciones

respecto al instrumento no se documentan apropiadamente. Para ello puede resultar suficiente el uso de un libro o cuaderno donde se anotan los análisis de rutina del laboratorio. Pero, en nuestra experiencia es preferible utilizar un registro adicional. En éste es conveniente colocar toda la información que pueda ser de utilidad para el operador del equipo cromatográfico (por ejemplo: número de teléfono y dirección del service autorizado del instrumento) junto con el registro de **todos los cambios** que se realicen (por ejemplo: sellos de los inyectores o de las bombas), y **todas las observaciones** que sean necesarias. Por ejemplo: se ha notado un ligero aumento en la presión debido a la guardacolumna, presión inicial no detectable, presión final 100 psi, al invertirla la presión disminuyó hasta su valor normal. Es muy importante que todas estas anotaciones sean firmadas y fechadas por el analista que las ha realizado para que los hechos se puedan reconstruir cuando fuera necesario.

En el caso de las columnas, es necesario que se lleve un registro adicional donde consten datos de utilidad como la cantidad de inyecciones realizadas o la fecha de entrada de la columna al laboratorio. Este tema será discutido más adelante.

Regla 6: **Regla buffer**. La regla buffer se refiere a la eliminación **completa** de los buffers y las sales del equipo cromatográfico cada vez que se los utiliza. Las sales pueden precipitar dentro de las columnas, filtros o tuberías del equipo cromatográfico, también pueden rayar a los pistones, deteriorar los sellos, o depositarse sobre las uniones. La remoción de las sales del instrumento debe realizarse con agua o con mezclas de agua con solventes orgánicos. **Nunca con solvente puro** pues pueden precipitar en contacto con el solvente orgánico. De hecho, la mejor remoción se logra con agua pura, pero luego el agua debe eliminarse con metanol para evitar el crecimiento de bacterias dentro del instrumento. Una alternativa consiste en agregar al agua azida sódica al 0.002 - 0.04 %[1,4,7,8].

También es posible remover las sales con mezclas de agua y solventes orgánicos pero, en ese caso, debe considerarse la proporción de agua-solvente orgánico que las remueva adecuadamente y que la columna quedará almacenada con algo de agua. Runser[4] recomienda almacenar las columnas utilizando solvente orgánico puro para evitar la disolución que sufre la silicagel en presencia de agua. Por otro lado es conveniente recordar que percolando 20 volúmenes de columna de metanol puro se logra la remoción no sólo del agua sino también de las sustancias no polares retenidas en la superficie no polar del material de relleno de la columna. La presencia de esas impurezas en la superficie puede, en el peor de los casos, modificar la selectividad de la columna en separaciones posteriores.

Tabla 13.1 Problemas instrumentales:Pérdidas

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
1) Uniones que pierden solvente	a) Unión floja	Ajustar la unión hasta que se verifique la ausencia de pérdidas
	b) Férula o tornillo deformados	Reemplazar tanto la férula como el tornillo
	c) Unión demasiado ajustada	Aflojarla y ajustarla nuevamente primero a mano y luego con las herramientas si la pérdida continua, reemplazar tanto la férula como el tornillo
	d) Unión sucia	Limpiar la unión y proceder según 1-c
	e) Uniones no compatibles	Utilizar uniones de un mismo fabricante o conectores de tipo universal
2) Pérdidas en los conectores de la columna	a) Uniones flojas	Véase punto 1-a
	b) Material de relleno de la columna depositado sobre la unión	Véase punto 1-d
3) Pérdidas en el inyector	a) Jeringa con aguja de punta defectuosa, de diámetro o longitud inadecuada	Cambiar la aguja de la jeringa. Verificar que esta corresponda a lo especificado en el manual del inyector
	b) Sellos del inyector o del rotor flojos o defectuosos	Ajustar o reemplazar los sellos o rotor
	c) Loop de muestra bloqueado	Desbloquearlo o bien en contracorriente con la ayuda de la bomba a su máxima capacidad, o bien fluyendo HNO_3 entre el 10 y el 50 % V/V

➡

3) Pérdidas en el inyector (cont.)	d) Línea de descarga bloqueada o haciendo sifón	Desbloquearla según 3-c o utilizar un tubo más fino que produzca una mayor resistencia
4) Pérdidas en el detector	a) Ventanas de la celda rotas	Reemplazarlas
	b) Uniones que pierden solvente	Véase punto 1
	c) O-rings de la celda sucios o gastados	Limpiarlos con etanol o reemplazarlos
	d) Línea de descarga bloqueada o haciendo sifón	Desbloquearla según 3-c o cambiarla tratando de que genere cierta resistencia
5) Pérdidas en la bomba	a) Uniones que pierden solvente	Véase punto 1
	b) Válvulas que pierden solvente	Véase punto 1
	c) Válvulas sucias	Con la ayuda de una jeringa o de la bomba circular HNO_3 como se indicó en 3-c. Si este tratamiento no diera el resultado esperado desarmar las partes y sonicarlas en HNO_3 al 50 % V/V
	d) Sellos del pistón	Cambiar los sellos defectuosos
	e) Sellos del mezclador	Cambiar los sellos defectuosos
	f) Mezclador de solventes sucio	Proceder según lo indicado en 5-c
	g) Válvula de purga floja	Ajustarla según 1-a
	h) Válvula de purga sucia o defectuosa	Cambiar los filtros o la válvula

Tabla 13.II Problemas instrumentales: Anormalidades en la presión

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
6) Alta Presión constante	a) Taponamiento en la bomba	Aislar la zona que se ha bloqueado y destaparla según 3-c
	b) Taponamiento en el inyector	Véase punto 6-a
	c) Taponamiento en el filtro de entrada de la columna o guarda-columna	Invertir la columna o la guardacolumna. Si el filtro bloqueado es el de la columna antes de hacerlo verificar la ausencia de espacios vacíos en la cabeza de la columna. De lo contrario el relleno puede reacomodarse dañando irreversiblemente la columna. Durante esta operación asegurarse que la salida de líquido vaya hacia una descarga y no hacia otro componente del instrumento pues puede bloquearlo.
		Reemplazar el filtro
	d) Taponamiento en el material de relleno de la columna	Lavar la columna utilizando solventes que disuelvan la sustancia precipitada. Si ésta no se conoce, utilizar el sistema de lavado general sugerido por el fabricante o el recomendado en la figura 13.2
		Con una punta de espátula mover la porción inicial de material de relleno y reemplazarlo por uno nuevo
		Reemplazar la columna

➡

6) Alta Presión constante (Cont.)	e) Taponamiento en las tuberías	Desbloquearlas según lo indicado en 3-c
		Reemplazarlas
	f) Fase móvil precipitada o sucia	Filtrarla por membrana de 0.22 ó 0.45 µm
		Preparar una nueva fase móvil
	g) Temperatura baja	Controlar y ajustar el controlador de temperaturas
	h) Medidor de presión descalibrado	Calibrar o reparar
7) Presión en ascenso	a) Véase punto 6: "Alta Presión constante"	
	b) Durante el cambio de solventes:	
	* Puede ser normal	Verificar si el incremento en la presión es el esperado teniendo en cuenta la viscosidad de las mezclas de solventes
	* Sales que precipitan en la entrada de la bomba	Remover la columna y lavar rápidamente la bomba con unos 30 ml de ácido nítrico entre el 10 y 50 % V/V
	* Sales que precipitan en la entrada de la columna	Invertir la columna como se indicó en 6-c pasando agua caliente a través de la misma
8) Baja Presión Constante	a) Aire atrapado en los cabezales de bombeo	Purgar la bomba con la ayuda de una jeringa. En esta operación el MeOH y EtOH remueven mejor el aire que el agua. Si el aire persiste mejorar la desgasificación del solvente.

8) Baja Presión constante	b) Pistón roto	Cambiar el pistón
	c) Filtro de entrada de solvente sucio o tapado	Sonicar con HNO_3 entre el 10 y el 50 % V/V
		Cambiarlo
	d) Válvula de purga sucia o tapada	Véase 8-c
	e) Válvulas de los cabezales de bombeo sucias o tapadas	Véase 5-c
	f) Válvulas de los cabezales de bombeo defectuosas	Cambiar las válvulas
	g) Medidor de presión descalibrado	Calibrarlo o repararlo
	h) Selector de caudal descalibrado	Calibrarlo o repararlo
	i) Temperatura alta	Ajustar el controlador de temperaturas
	j) Pérdidas en el sistema	Véase tabla 13-I: "Pérdidas"
9) Presión en descenso	a) Véase punto 8: "Baja Presión Constante"	
	b) Véase puntos 10 y 11; "No hay presión, no hay caudal" y "No hay presión, caudal normal"	
10) No hay presión no hay caudal	a) Aire atrapado en los cabezales de bombeo	Véase 8-a
	b) Aire atrapado en la entrada de la bomba o en las tuberías de líquido	Purgar la bomba con la ayuda de una jeringa
		Verificar el estado de los filtros de entrada del solvente y de la válvula de purga.

➡

10) No hay presión no hay caudal (cont.)	c) Válvulas de los cabezales de bombeo sucias o tapadas	Véase 5-c
	d) Pistón roto	Véase 8-b
	e) La bomba no funciona	Chequear en encendido y el estado de los fusibles
		Chequear los cortes por alta y baja presión
		Revisar el motor y/o sistema eléctrico
11) No hay presión caudal normal	a) Medidor de presión descalibrado o defectuoso	Calibrarlo o repararlo
12) Presión no constante	a) Aire atrapado en los cabezales de bombeo	Véase 8-a
	b) Aire atrapado en la entrada de la bomba o en las tuberías de bombeo	Véase 10-b
	c) Pistón roto	Cambiar el pistón
	d) Durante el cambio de solventes: * Puede ser normal * Sales precipitadas en las tuberías * Sales precipitadas en la cabeza de la columna	Véase 7-b
	e) Pérdidas en el sistema	Véase tabla 13.I: "Pérdidas"

Tabla 13.III Problemas instrumentales:Otros

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
13) Manecilla del inyector difícil de mover	a) Rotor demasiado ajustado	Aflojarlo
	b) Rotor dañado	Reemplazarlo
14) Operación de inyección de muestra difícil	a) Jeringa tapada o sucia	Limpiar la jeringa o la punta de la jeringa Si se está utilizando una jeringa con la punta renovable, cambiar la punta de la jeringa
	b) Loop de muestra bloqueado	Véase 3-c
15) Irreproducibilidad en la cuantificación	a) Pérdidas en el sistema	Véase tabla 13.I:"Pérdidas"
	b) Separación deficiente	Mejorar la separación
	c) Interacción del analito con la fase móvil	Cambiar el sistema cromatográfico
	d) Integración deficiente	Utilizar los parámetros de integración adecuados para la separación
	e) Analito inestable	Determinar la estabilidad del analito en la fase móvil y en las soluciones muestra y testigo
	f) Loop de muestra mal cargado	Cargar como mínimo 5 veces el volumen nominal del loop

Tabla 13.IV Problemas cromatográficos

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
16) Picos con base cuadrada	a) Optica del detector UV fuera de ajuste	Ajustar la óptica del detector
	b) El detector envía una ddp negativa en la línea de base	Ajustar el cero de señal
17) Derivas de la línea de base	a) Mala desgasificación del solvente	Mejorar el sistema de desgasificación de la fase móvil.
	b) Impurezas en el solvente	Utilizar solventes de mejor calidad, en lo posible grado HPLC
	c) Impurezas que emergen de la columna luego de una inyección	Esperar la elución del pico tardío
		Mejorar el sistema de preparación de las muestras de manera tal de aislar la sustancia que eluye tardíamente
	d) Impurezas que emergen de la columna sin la inyección de muestra	Estas impurezas son sustancias muy retenidas que provienen de muestras "sucias" en columnas deficientemente lavadas después de cada día de trabajo. Para eliminarlas habitualmente basta con esperar que la fase móvil alcance el equilibrio. Si el equilibrio tarda demasiado tiempo en alcanzarse es recomendable lavar la columna con algún solvente que remueva las sustancias muy retenidas o con el sistema de lavado general de las columnas (Ver figura 13.2)

➡

17) Derivas de la línea de base (cont.)	e) Pérdidas en el sistema	Véase Tabla 13.I: "Pérdidas"
	f) Variaciones de temperatura	Termostatizar la columna o colocar el instrumento en una zona del laboratorio donde no existan gradientes de temperatura
	g) Falta de equilibrio en la lámpara UV	Esperar que se alcance el equilibrio
	h) Lámpara del detector	Reemplazar la lámpara defectuosa
	i) Celda del detector sucia	Limpiarla circulando IPA o HNO_3 al 10 % con la ayuda de una jeringa o bien desarmarla y limpiar las ventanas con IPA
	j) Celda del detector	Reemplazar la ventana rota
18) Ruido	a) Lámpara agotada o con baja energía	Reemplazar la lámpara
	b) Aire atrapado en la bomba	Véase 8-a
	c) Filtro de salida de la columna eliminando partículas hacia el detector	Reemplazar el filtro
	d) Aire en la celda del detector	Mejorar la desgasificación del solvente
		Limpiar la celda según lo indicado en 17-i
	e) Celda del detector sucia	Limpiar la celda según lo indicado en 17-i

➡

18) Ruido (cont.)	f) Filtro de 280 nm (de óxido de fósforo) de los detectores UV fijos defectuoso	Reemplazar el filtro
	g) Falta de conexión a tierra (estática)	Conectar el instrumento a tierra con una lanza
	h) Pérdidas en el sistema	Véase tabla 13.I:"Pérdidas"
	i) Electrónica ruidosa	Conectarse con el personal de service del instrumento
19) Derivas en los tiempos de retención	a) Falta equilibrio de la fase móvil	Equilibrar la columna hasta obtener una línea de base plana (como mínimo 20 volúmenes de columna, y algo más que ese valor en IPC)
	b) Cambios en la fase móvil	Evitar la evaporación del componente más volátil
		En fase normal. Para evitar los cambios de retención generados por la absorción de agua del ambiente, agregar IPA a la fase móvil o saturarla con agua
	c) Cambios en la temperatura	Colocar el equipo de HPLC en zonas del laboratorio donde no existan gradientes de temperatura
20) Tiempos de retención más cortos que los esperados	a) Pérdida de los grupos C18 de la columna	En alguna medida es normal Se debe, como hemos visto, a la hidrólisis de las cadenas alquílicas en medios acuosos. Si los picos hallados son simétricos y la columna no ha perdido su capacidad separativa ($R \geq 1.5$),no es conveniente

➡

20) Tiempos de retención más cortos que los esperados (cont.)	a) Pérdida de los grupos C18 de la columna (cont.)	reemplazarla sino que se suele adecuar el sistema modificando la proporción de agua:solvente orgánico. La disminución en los t_r detecta en los solutos que no interactuan con los grupos silanol de la columna mientras que los solutos silanofílicos suelen aumentar sus t_r.
	b) Material de relleno de la columna contaminado	Lavar la columna con un solvente capaz de remover las sustancias que la han contaminado. Si éstas no se conocen utilizar el sistema general de lavado descrito en la figura 13.2
		No utilizar columnas que se han usado con reactivos de IPC para otras aplicaciones. Estos reactivos se unen irreversiblemente a la columna y la modifican
		Reemplazar la columna
	c) Fase móvil inadecuada	Prepararla nuevamente
	d) Temperatura errónea	Véase 6-g
	e) Caudal de la fase móvil inadecuado	Véase 8-h
	f) Columna sobrecargada	Inyectar concentraciones menores
21) Tiempos de retención más largos que lo esperado	a) Material de relleno de la columna contaminado	Véase puntos 20-a y 20-b
	b) Fase móvil inadecuada	Véase punto 20-c

➡

21) Tiempos de retenc. más largos que lo esp. (cont.)	c) Temperatura errónea	Véase punto 6-g
	d) Caudal inadecuado	Véase punto 8-h
22) Cambios en la selectividad del sistema	a) Material de relleno de la columna contaminado	Véase punto 20-a y 20-b
	b) Fase móvil inadecuada	Véase punto 20-c
23) Cambios bruscos en los tiempos de retención	a) Pérdidas en el sistema	Véase tabla 13.I:"Pérdidas"
	b) La bomba no entrega la cantidad requerida de solvente	Véase punto 8:"Baja presión constante"
24) Algunos picos presentan tailing, dan dobles picos o se distorsionan	a) Disociaciones parciales, más de un mecanismo de retención o heterogeneidad de sitios	En fase normal. Agregar: * TEA para analitos básicos * Acido acético para analitos ácidos * Agua o IPA para compuestos polares
		En fase reversa. Suprimir disociación o el mecanismo adicional utilizando los aditivos recomendados. Ver texto
		En IPC. Modificar el pH para favorecer la disociación del analito y aumentar la concentración de apareante
	b) Efectos del solvente	Inyectar una solución del analito en fase móvil y comparar la forma que presenta el pico
25) Picos tempranos presentan tailing más pronunciado que picos tardíos	a) Efectos extracolumnares	Utilizar celdas del detector de menores volúmenes
		Utilizar tuberías de menor ID y longitud
		Utilizar una constante de tiempo baja

➡

26) Todos los picos presentan tailing o se distorsionan	a) Espacio vacío en la cabeza de la columna	Taparlo utilizando material de relleno
	b) Tuberías sucias	Limpiar las tuberías con HNO_3 entre el 10 y 50 % V/V
	c) Columna sobrecargada	Inyectar menores concentraciones de analito
	d) Volumen de inyección demasiado grande	Disminuir el volumen de de inyección
	e) Guardacolumna deteriorada	Cambiar el material de relleno de la guardacolumna
	f) Material de relleno de la columna contaminado	Véase 20-a y 20-b
27) Picos "fantasma"	a) Otros componentes de la muestra que son muy retenidos en la columna	Véase punto 17-c
28) Los picos se ensanchan al aumentar el tiempo de retención	a) Es normal. Véase ecuación 3.10	
29) La eficiencia no es constante a lo largo del cromatograma	a) En alguna medida es normal. Se debe fundamentalmente a los efectos extracolumnares	
30) Picos anchos	a) Columna con baja eficiencia	Véase puntos 20-a y 20-b "Columna contaminada"
	b) Constante de tiempo del detector demasiado elevada	Disminuir su valor
	c) En ciertos integradores, valor de ancho de pico demasiado elevado	Disminuir su valor
	d) En GPC puede ser normal porque el ancho del pico se relaciona con la distribución de pesos moleculares de los polímeros	

31) Picos negativos	a) Alta absorción proveniente de la fase móvil	Cambiar la fase móvil. Utilizar solventes con baja absorción UV, y cuya calidad sea reconocida
	b) En el volumen muerto. Alteración debida a la diferencia entre los índices de refracción de la fase móvil y el solvente de disolución de las muestras	

13.3 Problemas Instrumentales

Los problemas instrumentales se refieren a las fallas que se originan en el equipo cromatográfico. Como guía para el lector hemos clasificado este tema en tres partes de acuerdo a los síntomas que presente. La primera trata de las pérdidas de solvente (tabla 13.I), la segunda de las anormalidades en la presión (tabla 13.II) y la última de los otros problemas que pueden relacionarse a fallas en el instrumento (tabla 13.III). A continuación trataremos individualmente cada parte del equipo, sin detenernos a explicar el funcionamiento de los módulos del instrumento (ya descritos en el capítulo 2) sino los problemas habituales y los modos de resolverlos.

Tuberías

En general se emplean sólo dos tipos de materiales para confeccionar las tuberías del equipo de HPLC: las de acero inoxidable (316 o 304) y las de plástico (teflón, polietileno, polipropileno o poliétercetona). Dado que las tuberías están en contacto permanente con las soluciones y solventes constituyen de por sí una fuente de problemas. Los problemas más significativos que suelen presentarse en las tuberías son:

A - Ataque químico
B - Corte deficiente
C - Taponamiento
D - Diámetro o longitud inadecuadas

A - Ataque químico

Afortunadamente el ataque químico es un fenómeno poco frecuente en HPLC tanto de las tuberías de acero como las de plástico. Las tuberías de acero son las que más se utilizan por su resistencia a las presiones y al desgaste mecánico, pero aún las más inertes pueden sufrir corrosión en presencia de determinadas sustancias.

Por ello, es aconsejable evitar el uso de fases móviles conteniendo compuestos como los haluros que atacan al acero inoxidable. En los casos donde es necesario utilizarlos, las partes del instrumento en contacto con la fase móvil se pueden pasivar con ácido nítrico entre el 20 y 50 % V/V[9]. Existen igualmente otras sustancias o mezclas de sustancias que resultan nocivas para el equipo de HPLC. Para ampliar este tema consúltese la sección 4.4.

B - Corte Deficiente

El corte deficiente de las tuberías es una de las fallas más frecuentes en HPLC. Los tubos plásticos pueden cortarse fácilmente, pero en el corte de los tubos de metal aparecen habitualmente rebabas, superficies deformadas y taponamientos debidos a la liberación

de virutas de acero. En este aspecto resulta más conveniente adquirir tubos precortados de diversas longitudes en lugar de varios metros de tubo sin cortar aunque su costo es, evidentemente, superior.
Por otro lado cada vez que se corta un tubo se lo debe conectar a la bomba en uno de sus extremos **dejando el otro extremo libre** y luego pasar a través de él algunos mililitros de fase móvil con la ayuda de la bomba con el objeto de eliminar las virutas de acero que pueden haber quedado en el interior del mismo. Esta operación impide que, al conectarlo, se produzca el taponamiento del componente siguiente en el instrumento.
Tuberías mal cortadas pueden generar alta presión en el sistema por el taponamiento de la punta del tubo con virutas, pérdidas debido al cierre deficiente de las uniones o ensanchamientos extracolumnares por el aumento en el volumen muerto de las mismas.
Para controlar la ausencia de tubos parcialmente bloqueados puede realizarse el **Ensayo de presión del sistema cromatográfico** que se indicará más adelante.

C - Taponamiento

El taponamiento de las tuberías puede originarse por factores bastante comunes como:

- ***Precipitación de sales***

  Este fenómeno suele ocurrir cuando en el equipo de HPLC se interrumpe el caudal de una fase móvil conteniendo sales durante un período medianamente prolongado de tiempo o si se juntan en la entrada de la bomba fases móviles no compatibles entre sí como una fase móvil conteniendo alta concentración de solvente orgánico con otra conteniendo altas concentraciones de sales.

  La precipitación de sales presentes en la fase móvil se previene lavando el equipo con agua (no menos que 20 volúmenes de columna) o con mezclas de agua con solventes orgánicos en baja proporción. Para mayores detalles sobre este tema consúltese la regla 6 (regla Buffer) en la sección 13.2.

- ***Partículas presentes en la fase móvil o la muestra***

  El taponamiento debido a la presencia de partículas de la fase móvil y/o muestras se previene filtrando tanto la fase móvil como las muestras por membranas adecuadas.(ver las secciones 4.5 y 9.2).

- ***Liberación de partículas***

  La liberación de partículas desde la columna analítica, la columna de saturación o la guardacolumna es un hecho bastante habitual en HPLC que no puede evitarse completamente. La mejor manera de minimizarlo es evitar cambios bruscos de la presión (es decir modificaciones bruscas en el caudal) que pudieran favorecer esa liberación.

- ***Presencia de virutas de acero***

  La aparición de virutas de acero proveniente de cortes de las tuberías puede generar, como se ha indicado, taponamientos de las tuberías.

El taponamiento de una tubería puede detectarse por el incremento en la presión del sistema cromatográfico y, antes de efectuar alguna acción al respecto, es necesario aislar la zona que se ha tapado. Para ello es conveniente recordar que las tuberías de diámetro interno más pequeño se tapan con mayor facilidad que las que poseen un diámetro interno más grande. Como punto de referencia debe considerarse que la presión normal debida a las tuberías con sus respectivas uniones debe ser prácticamente cero en los caudales habituales de operación del instrumento.

Es necesario controlar periódicamente la presión debida a todo el sistema cromatográfico sin columna, precolumna, guardacolumna o columna de saturación las cuales para realizar el ensayo, se reemplazan por una unión. Este ensayo, denominado **Ensayo de presión del sistema cromatográfico**, se utiliza para reconocer si existen zonas bloqueadas que contribuyan a un exceso de presión en el instrumento. Para ello se registra la presión ejercida por un solvente determinado (agua, metanol), a un caudal definido (2 a 5 ml/min). Es necesario controlar que, durante esta operación, la presión no exceda al valor máximo que soporta la celda del detector, porque puede romperse. La presión normal depende del instrumento y debe registrarse inicialmente. Cualquier incremento en el valor normal indicará una falla en el sistema (zonas tapadas del instrumento o a tuberías mal cortadas).

Para desbloquear una tubería que se ha tapado se la suele conectar a la bomba dejando libre uno de sus extremos. Utilizando la bomba a su máxima capacidad se intenta pasar un disolvente que disuelva el material precipitado. En el caso de la precipitación de sales el pasaje de agua caliente suele dar muy buenos resultados. Si la sustancia que produjo el bloqueo no se conoce puede recurrirse al ácido nítrico de hasta 50 % V/V para poder destaparla.

Habitualmente, el taponamiento en HPLC se relaciona principalmente con los filtros de las columnas y guardacolumnas y, raramente, con las tuberías.

1. Evite el uso de haluros y otras sustancias que puedan atacar al acero inoxidable
2. Filtre apropiadamente los solventes y las muestras
3. Adquiera tubería precortada en lugar de varios metros de tubería sin cortar
4. Lave adecuadamente el instrumento con agua luego de utilizar fases móviles conteniendo sales (Regla Buffer)
5. Rotule convenientemente las tuberías de diferentes diámetros

Tabla 13.V Consejos útiles para el buen mantenimiento de las tuberías

D - Diámetro o longitud inadecuadas

La utilización de tubos de diámetro o longitud inadecuada es el último problema que puede asociarse a las tuberías. Como hemos visto en la sección 2.3 , existen diversos tipos de tuberías cuyos diámetros internos oscilan entre 0.18 y 0.50 mm (0.007 y 0.020 pulgadas). Para minimizar el fenómeno de ensanchamiento de banda la tubería más delgada se utiliza en las zonas del cromatógrafo por donde circula la muestra antes de ser detectada. Es muy difícil distinguir entre cada tipo de tubería por simple apreciación visual, por lo cual, para evitar confusiones es recomendable separarlas y rotularlas adecuadamente. La longitud es otro parámetro clave para minimizar los ensanchamientos de banda extracolumnares. Esta longitud puede tener una gran influencia en la eficiencia del sistema.

Uniones

Las uniones que se utilizan en los instrumentos de HPLC son de bajo volumen muerto y deben ser resistentes tanto a las altas presiones como a los solventes que se utilizan. Existen básicamente dos tipos de uniones: las de acero inoxidable convencionales y las uniones universales. Las primeras tienen una gran resistencia a las presiones, mientras que las segundas, de desarrollo posterior, utilizan un tornillo de acero y una férula de teflón y son muy cómodas pues pueden ajustarse manualmente. Los problemas habituales que con las uniones suelen presentarse se describen a continuación:

A - Desgaste mecánico
B - Ajuste excesivo o deficiente
C - Corte deficiente de la tubería (Ver Tuberías)
D - Presencia de suciedad o partículas
E - Incompatibilidad

A - Desgaste mecánico

Las uniones, especialmente aquellas que se encuentran antes de la cabeza de la columna (la zona de mayor presión del instrumento) sufren un desgaste mecánico importante. Su hermeticidad está dada por la férula encargada de sellarlas. Cada vez que la unión se cierra se necesita más presión para lograr hermeticidad y, consecuentemente, la férula se deforma un poco más. Este proceso continua hasta que, finalmente, la férula se deforma tanto que deja de efectuar el cierre. En ese momento la unión comienza a perder líquido. Así, es posible deducir que el desgaste mecánico de las uniones es un proceso normal en HPLC y que, por lo tanto, no puede eliminarse completamente aunque sí puede minimizarse. La mejor manera de hacerlo consiste en mantenerlas limpias, evitar su ajuste excesivo y no mezclar las uniones de diferentes fabricantes. Todos estos temas se discutirán a continuación.

B - Ajuste excesivo o deficiente

Como hemos visto en el punto A, la vida útil de las uniones puede prolongarse si se evita ajustarlas excesivamente. En primera instancia, el tornillo se debe enroscar con la mano hasta que la fuerza ejercida sea insuficiente y recién entonces debe recurrirse al uso de herramientas, ajustando no más que 3/4 de vuelta. Para realizar esta operación es conveniente utilizar llaves de las denominadas "fijas" en lugar de las ajustables debido a que estas últimas pueden dañar las cabezas de los tornillos de las uniones. Además, es conveniente utilizar las herramientas provistas con el mismo instrumento u otras similares ya que si se reemplazan las llaves fijas por otras más largas, la fuerza de torsión (palanca) será mayor y el cuello del tornillo puede romperse.

El hecho de no poder ajustar las uniones con la mano indica, necesariamente, la presencia de un problema. Este puede ser sencillo, como que el tornillo ha encajado mal en la hembra correspondiente, o puede ser más complejo. Si, en esos casos, se recurre al uso de herramientas se corre el peligro de deformar irreversiblemente un tornillo y tener que reemplazar la unión en forma prematura.

El problema del ajuste deficiente de las uniones se soluciona, simplemente, ajustándolas. El ajuste deficiente y el ajuste excesivo son problemas que pueden aparecer tanto en las uniones convencionales de acero como en las universales. Ambos problemas presentan, de hecho, los mismos síntomas: pérdidas de solvente.

D - Presencia de suciedad o partículas

La presencia de suciedad o partículas tanto en la férula como en el tornillo dificultan la operación de cierre y favorecen el normal desgaste mecánico de las uniones. La mejor manera de evitar que esta suciedad acelere el desgaste consiste en filtrar convenientemente los solventes y las muestras (ver secciones 4.5 y 9.2) y circular fase móvil (si ésta no contiene buffers) a 0.5 ml/min cuando las mismas se abren o cierran. El solvente no sólo limpia las superficies de contacto sino que actúa como lubricante facilitando la operación de cierre.

E - Incompatibilidad

El último problema a tratar es la incompatibilidad que existe entre las uniones de diferentes fabricantes. De hecho este problema es muy común y pocos analistas lo tienen realmente en cuenta.

Las férulas, tornillos y uniones hembra-hembra de diversos fabricantes no son equivalentes entre sí, por lo cual, estrictamente hablando, no deberían intercambiarse. Las diferencias en algunos casos son mínimas y, por ende, muchos analistas acostumbran a mezclarlas.

Las partes de las uniones y las uniones ya fijadas deben considerarse por separado. Habitualmente las partes pueden intercambiarse antes de fijar la férula a la tubería debido a que las férulas de algunos fabricantes son semejantes entre sí y que, al fijarse, adoptan

la forma del conector hembra que se utiliza en la operación. En contrapartida, una vez que ésta ha sido fijada (y deformada) de acuerdo a un conector dado, el cambio por un conector de otro fabricante con una superficie interna diferente puede producir pérdidas o volúmenes muertos. Adicionalmente la longitud libre del tubo después de la férula y la longitud de los tornillos son parámetros que también difieren de fabricante en fabricante. Los problemas más serios suelen presentarse cuando se intercambian las partes de los fabricantes que tienen las mayores diferencias entre sí y cuando se requieren bajos volúmenes muertos como en la cromatografía de alta velocidad o la cromatografía microbore.

Bombas

El buen funcionamiento de la bomba es indispensable para obtener separaciones reproducibles por lo cual resulta conveniente controlar su estado periódicamente. El control del estado de la bomba debe incluir la medición de la **exactitud en el caudal** (midiendo el volumen de líquido que eluye de la bomba por unidad de tiempo), y el control de **pérdidas**. La ausencia de pérdidas debe verificarse diariamente simplemente pasando un papel absorbente por las uniones y detrás de los cabezales de la bomba y periódicamente llevando la bomba hasta su máximo valor de presión.
Como hemos visto en la sección 2.5 existen básicamente dos tipos de bombas: las bombas a pistón y las bombas a jeringa. En esta sección sólo trataremos las primeras por ser las que más se utilizan en HPLC. Las bombas sufren un desgaste mecánico importante debido a que trabajan en la zona de alta presión del instrumento y que muchas de sus partes son móviles. Muchos de los problemas de las bombas se detectan simplemente observando

1. Para el cierre utilice herramientas apropiadas
2. No fuerce las uniones
3. Filtre apropiadamente los solventes y las muestras
4. No intercambie uniones de diferentes fabricantes
5. Siempre que sea posible cierre y abra las uniones con solvente fluyendo
6. Rotule adecuadamente las uniones para evitar confusiones

Tabla 13.VI Consejos útiles para el buen mantenimiento de las uniones

el cromatograma o el medidor de presión[13]. Los problemas que se presentan más frecuentemente en las bombas están relacionados con:

A - Las tuberías (ver "Tuberías")
B - Las uniones (ver "Uniones")
C - El suministro de solventes
D - El sistema de bombeo

C - El suministro de solventes

El sistema de suministro de solventes, dependiendo del fabricante del instrumento, puede formar parte del equipo de HPLC o puede ser externo. En el último caso se utilizan habitualmente recipientes de vidrio que se conectan a la bomba del equipo de HPLC por medio de una tubería de teflón. En ambos casos pueden presentarse los siguientes inconvenientes:

- ***Taponamiento del filtro de solvente***
  Este filtro se coloca en el extremo de la tubería sumergido en el solvente y suele tener una porosidad de 2 a 10 µm. Su función es retener las partículas que puedan llegar a la bomba y, por ende, puede taparse. Un filtro tapado conduce a un fenómeno denominado cavitación en la línea de entrada de la bomba, cuyo resultado es la aparición de burbujas de aire en los cabezales de bombeo con lo cual se desestabiliza el caudal a la salida de la bomba. Para confirmar la existencia de este problema se puede sacar el filtro y observar si las anormalidades en el caudal (y la presión) persisten.
  Para evitarlo, basta con filtrar las fases móviles, mantener los reservorios de solvente limpios y evitar su contaminación microbiana. Los filtros tapados pueden limpiarse sonicándolos con HNO_3 al 50 % V/V seguido del lavado con abundante agua, y luego pueden testearse con la ayuda de vacío. Para evitar la cavitación es conveniente colocar los reservorios para solventes más elevados que la bomba, típicamente, unos 20 a 50 cm por encima de la entrada del solvente.

- ***Desgasificación deficiente***
  Como se ha visto anteriormente la presencia de oxígeno disuelto en la fase móvil es origen de numerosos problemas en HPLC, entre otros comprometiendo el normal funcionamiento de las bombas y los detectores. La solución a este problema es muy simple: desgasificar las fases móviles. Una explicación detallada de los métodos de desgasificación sus ventajas e inconvenientes se encuentra en la sección 4.5.

D - El sistema de bombeo

El sistema de bombeo está formado por los pistones, sus sellos, las cámaras de bombeo, los cabezales de las bombas y las válvulas de entrada y salida de los cabezales. Los problemas asociados al sistema de bombeo generan anormalidades en la presión y el caudal y, eventualmente, pérdidas en la bomba.

- ***Pistones***

  Si las sales que se utilizan en las fases móviles no se remueven adecuadamente del instrumento (regla buffer) es posible que se depositen en la superficie de los sellos de los pistones. Este depósito de sales puede desgastarlos por abrasión y, en el peor de los casos, impedir su movimiento. La ruptura de un pistón durante la operación habitual de HPLC es un hecho bastante poco frecuente pero es muy común que el pistón se rompa accidentalmente cuando se desarman los cabezales de bombeo. Por este motivo el cambio de los sellos de los pistones debe efectuarse siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante del instrumento.

- ***Sellos de los pistones***

  Los sellos tienen la función de evitar la abrasión de los pistones por el acero inoxidable de los cabezales de bombeo y, al mismo tiempo, impedir las pérdidas de solvente a través del pistón. El desgaste mecánico habitual que sufren es muy importante por lo cual se recomienda cambiarlos regularmente sin esperar que fallen. Este desgaste, como vimos anteriormente, se ve incrementado si no se remueven adecuadamente las sales del instrumento y si se utilizan solventes como el THF[14] que los deterioren prematuramente.

  Oscilaciones del caudal (y la presión), con pérdidas de solvente en los cabezales de bombeo e incapacidad de la bomba para alcanzar altas presiones son los síntomas habituales que indican el deterioro de los sellos. Otro de los problemas de los sellos es la liberación de partículas originadas por el desgaste mecánico. Estas partículas pueden, en algunos casos, bloquear otros componentes del equipo cromatográfico.

- ***Válvulas***

  Las válvulas de los cabezales de bombeo tienen la función de regular la dirección del movimiento del solvente impidiendo el movimiento en la dirección contraria. Existen, básicamente, dos problemas asociados a las válvulas: la presencia de burbujas de aire y la contaminación con partículas.

  La aparición de burbujas de aire es uno de los problemas más comunes en HPLC. Las burbujas quedan "atrapadas" en las válvulas de los cabezales que actúan como centros de nucleación, impidiendo el pasaje de solvente a través de las mismas. Este problema puede evitarse desgasificando la fase móvil (ver sección 4.5). Una vez que el aire ha sido atrapado en alguna de las válvulas, es posible eliminarlo o bien disolviéndolo, o bien forzando su pasaje a través de la bomba con la ayuda de una jeringa. En esta última operación es conveniente utilizar metanol o etanol en lugar de agua o fase móvil debido a que "empujan" con mayor facilidad al aire atrapado (siempre y cuando el solvente que está en la bomba sea compatible con el etanol y el metanol puros).

  La contaminación con partículas se previene filtrando los solventes (ver sección 4.5). Si las válvulas ya se han contaminado se puede intentar limpiarlas pasando agua o etanol. Si esta operación no da buenos resultados es posible extraer de la bomba las partes que la conforman y sonicarlas en HNO_3 al 50 % V/V[14]. Esta operación, como el posterior armado de los cabezales de bombeo requiere sumo cuidado y limpieza.

Inyectores

Como hemos visto en la sección 2.7, existen, fundamentalmente dos tipos de inyectores, los de uso manual y los automáticos. Tanto los inyectores manuales como los automáticos consisten, básicamente, en una válvula de seis vías en una de las cuales se deposita la muestra a presión atmosférica. Obviamente los segundos resultan mucho más complejos que los primeros porque tanto la carga como el movimiento de la válvula se debe regular automáticamente. En este capítulo trataremos exclusivamente de los inyectores manuales, ya que las diferencias entre los inyectores automáticos de varios fabricantes son suficientemente grandes para poder generalizarlas.

La instrumentación de un control periódico del inyector no tiene demasiado sentido dado que, o bien la falla es muy evidente (pérdidas), o bien se supone que el inyector se controla a diario durante el ensayo de precisión del sistema con estándares. En este ensayo se inyectan varias veces (típicamente 3 o 5 veces) la solución estándar y se determina el error

1. Evitar las altas presiones
2. Filtrar las fases móviles por membranas adecuadas
3. Desgasificar las fases móviles
4. Antes de apagar la bomba eliminar todo resto de sales con agua y luego eliminar el agua con metanol
5. Si, por razones operativas, no es posible detener el instrumento de HPLC para el cambio de sellos de la bomba, se recomienda hacerlo, preventivamente, cada 3 meses
6. Utilizar filtros en la tubería de entrada del solvente
7. Colocar el reservorio de solventes en un estante elevado (a unos 20 - 50 cm de la entrada de la bomba)
8. Llevar un registro de todos los cambios realizados en la bomba
9. Aceitar frecuentemente las bombas que contienen motores eléctricos
10. No utilizar solventes muy volátiles como éter o pentano

Tabla 13-VII Consejos útiles para el buen mantenimiento de las bombas

(RSD) entre inyecciones.

Los problemas más frecuentes de los inyectores se relacionan con:

A - Las tuberías (ver "Tuberías")
B - Las uniones (ver "Uniones")
C - La válvula de inyección

C - La válvula de inyección

Los problemas asociados a la válvula de inyección se refieren en especial al desgaste mecánico, taponamientos, pérdidas, u otras dificultades en la operación normal del rotor. Todos los componentes del equipo de HPLC sufren el desgaste mecánico en particular aquellos que están sometidos a las mayores presiones como bomba e inyector. Por esta razón, es aconsejable operar con las menores presiones posibles para prolongar su vida útil.

Los taponamientos surgen, como en el caso de las tuberías, de solventes o muestras inadecuadamente filtradas, precipitación de sales o liberación de partículas desde la columna de saturación. Estas partículas, además, pueden rayar tanto el rotor como sus sellos y bloquear las vías de la válvula del inyector.

La limpieza de una zona tapada suele realizarse fluyendo líquido en contracorriente con la ayuda de la bomba. Si ésto no da el resultado esperado es posible desarmar el inyector y sonicar sus componentes con un solvente adecuado (HNO_3 al 10 % V/V, diclorometano, o detergente). Dolan[1] recomienda no utilizar solventes cuyo pH sea mayor que 9 debido

1. Evitar presiones elevadas
2. Filtrar adecuadamente las muestras
3. Filtrar adecuadamente los solventes
4. Utilizar jeringas de inyección con agujas apropiadas
5. Lavar con agua todo el circuito de la válvula cada vez que se opera con buffers (regla buffer) y luego eliminar el agua con metanol
6. Mover la manecilla desde la posición de inyección a la de carga (y viceversa) rápidamente
7. Si, por razones operativas, no es posible parar el instrumento para el cambio del sello del rotor se recomienda cambiarlo cada 6 meses

Tabla 13-VIII Consejos útiles para el buen mantenimiento del inyector

a que ciertos inyectores poseen piezas construidas con una poliimida que se solubiliza a esos valores de pH. En el armado final es aconsejable seguir estrictamente las indicaciones del fabricante, teniendo especial cuidado en evitar un ajuste excesivo del rotor. Un rotor excesivamente ajustado dificulta el movimiento normal de la válvula (se necesita mucha fuerza para mover la manecilla del inyector entre sus dos posiciones carga/inyección) y se reduce la vida útil de sus partes. En contrapartida, un rotor demasiado flojo puede conducir a pérdidas de solvente o de la misma muestra inyectada. En este caso la precisión entre inyecciones es mucho menor que la habitual.
Otro de los problemas de los inyectores de válvula se refiere a las pérdidas de solvente. Estas pérdidas se deben a las uniones, tema que ha sido discutido con anterioridad. Las pérdidas de solvente pueden deberse también al taponamiento de la línea de descarga o el loop de la muestra, fallas en el ajuste del rotor o uso de jeringas con agujas inadecuadas. El uso de agujas cuya punta o diámetro sea inadecuado es uno de los problemas que habitualmente se presentan con las jeringas que se utiliza para cargar la muestra. Las agujas que se utilizan en HPLC deben tener una punta cuadrada (bordes a 90°) para evitar rayaduras el rotor del inyector a diferencia de las que se utilizan en GC o TLC cuya punta es biselada.

Columnas

La columna de HPLC puede considerarse como el corazón del sistema cromatográfico, pues en ella tiene lugar la separación de los componentes presentes en las muestras. Por ende, se debe considerar que las fallas en las columnas conducen inevitablemente a pobres separaciones, independientemente del estado del instrumento.
Desafortunadamente el material de relleno de la columna no es tan resistente como el acero que lo rodea por lo que las columnas deben utilizarse apropiadamente, teniendo especial cuidado en su uso y mantenimiento. La vida útil de una columna depende de muchos factores (tipo y naturaleza de las muestras, tipo y naturaleza del solvente, temperatura de trabajo) y puede variar desde unas pocas inyecciones hasta algunos miles. De hecho, una columna que se emplea sólo para un tipo de muestras tiene, en general, mayor vida útil que aquella que se emplea "para todo uso". Ningún analista puede contentarse con una corta vida útil y frente un deterioro manifiesto de la columna luego de algunas inyecciones debe replantearse tanto del método cromatográfico como el de preparación de la muestra.
Para evaluar los efectos de cada fase móvil y tipo de muestra sobre la columna cromatográfica, de manera tal de poder replantear las metodologías más nocivas y establecer la "historia" de cada columna, es necesario destinar una columna para cada tipo de muestra a analizar en el laboratorio y llevar un registro de las mismas. Este registro debe contener todos los datos útiles referidos tanto a la columna como al uso que se le ha dado. La figura 13.1 muestra una planilla tipo de registro, que puede utilizarse para el control y seguimiento de las columnas.

Columna (Tipo) .... Fabricante ....
Recibida .... Distribuidor ....
Número .... TE ....
.... Dirección ....

Longitud ....
ID ....
dp ....

Sistema de Control ....
Destinada a ....
Fase Móvil ....

Número de catálogo ....
Número de serie ....

Fecha	Analista	Número de inyecciones	Observaciones / Solvente de Almacenamiento	Control		
				N	t	R

Fig. 13.1 Planilla de control y seguimiento de las columnas de HPLC. En la columna "N" se colocan los números de platos de la columna calculados, en la columna "t" los tiempos de retención de las sustancias control y en la "R" la resolución entre pares de picos adyacentes.

Los problemas más frecuentemente encontrados en las columnas son:

A - Problemas relacionados a las uniones (Ver "Uniones")
B - Aumento de la presión
C - Pérdida de eficiencia
D - Modificación de la retención o la resolución

B - Aumento de la presión

Uno de los problemas más comunes en HPLC es el aumento en la presión de una columna. Este aumento puede deberse al taponamiento de filtros o a la contaminación química del material de relleno. Antes de intentar la solución de cualquiera de estos dos problemas es necesario verificar:

a) si efectivamente existe alta presión en el sistema
b) si la alta presión se debe a la columna o a otro componente del instrumento

El punto a) debe verificarse porque muchas veces un aumento de presión en el sistema que hace sospechar, en primer instancia, un taponamiento de la columna puede deberse a la utilización de un solvente o una mezcla de solventes muy viscoso. Para calcular la presión normal en una columna utilizando agua como fase móvil puede utilizarse la ecuación 4.1, y para determinar la presión en cualquier otro sistema de solventes basta con relacionar la viscosidad del solvente o de la mezcla con la del agua y multiplicarla por la presión resultante.
Las causas más comunes que originan un aumento en la presión del sistema cromatográfico debido a la columna son:

- ***Taponamiento de los filtros***
  Las columnas suelen tener filtros tanto a la entrada como a la salida de, habitualmente, unos 2 µm. Estos filtros pueden taparse y, consecuentemente, aumentar la presión del sistema. El filtro que se tapa con mayor facilidad es, naturalmente, el de entrada; al filtro de salida difícilmente lleguen partículas desde el exterior debido a que el material de relleno de la columna actúa, igualmente, como un filtro. El origen de esas partículas puede ser muy diverso: solventes, muestras inadecuadamente filtradas o partículas liberadas por los sellos de las bombas. El filtro de salida también puede taparse, pero en este caso son las partículas finas que pueden liberarse de la columna las que originan el taponamiento.
  El hecho de filtrar tanto los solventes como las muestras evita en gran medida el taponamiento de estos filtros pero esta acción no resulta, por sí sóla, suficiente. Resulta conveniente, además, agregar ciertos dispositivos para retener las partículas que, eventualmente, puedan "librarse" de los filtros y para aquellas, como las partículas de los sellos de las bombas, que se originan en el mismo instrumento cromatográfico. Estos dispositivos se denominan filtros en línea (**filtro precolumna**), **guardacolumna**, o **columna de saturación**. El filtro precolumna es únicamente un retentor

mecánico de las partículas mientras que los otros dos, además de su función mecánica, tienen otras funciones químicas que se describirán más adelante.
Para desbloquear un filtro tapado muchos analistas suelen colocar la columna en el sentido inverso. Esta operación es perfectamente lícita, pero antes de realizarla se deben considerar los siguientes puntos:

a) Factibilidad de inversión (consultar la información provista por el fabricante de la columna).
b) Ausencia de volúmenes muertos (espacios vacíos) en la cabeza de la columna; pues al invertirla pueden generar disturbios en el lecho de la misma.
c) En todos los casos debe desconectarse la salida de la columna al detector antes de producirse la inversión para evitar la contaminación de la celda con las impurezas provenientes de la cabeza de la columna.

Los filtros de las columnas pueden limpiarse sonicándolos con HNO_3, pero la experiencia indica que son difíciles de desbloquear y que los filtros "recuperados" suelen taparse nuevamente al cabo de poco tiempo. Por este motivo, y dado su bajo costo, resulta más sencillo y conveniente reemplazar los filtros tapados por nuevos en lugar de que intentar limpiarlos.

- ***Contaminación química del material de relleno***

  El aumento de presión es uno de los diversos síntomas que puede producir la contaminación química del material de relleno de la columna. Este aumento de presión normalmente se relaciona con la precipitación de sustancias dentro de la columna debido a su incompatibilidad con la fase móvil.

  Para evitarla, es necesario determinar la miscibilidad entre fases móviles antes de mezclarlas en el equipo cromatográfico y disolver las muestras en la misma fase móvil. Si la fase móvil es, por ejemplo metanol:agua, y la muestra se disuelve en un solvente más fuerte, por ejemplo metanol puro, es posible que algún componente de la muestra sea insoluble en metanol:agua y precipite a la entrada de la columna. Luego de una inyección (con metanol) es posible también que ese insoluble se vaya solubilizando y comience a migrar dentro de la columna modificando la selectividad o incrementando la presión del sistema.

  Todos los componentes de la muestra deben ser compatibles con la fase móvil (no sólo el analito), en caso contrario resulta muy conveniente utilizar procedimientos de preparación de las muestras que separen al analito de las sustancias que puedan precipitar en contacto con la fase móvil o la fase estacionaria. Por ejemplo: las proteinas deben eliminarse completamente de las muestras a inyectar, debido a que precipitan al entrar en contacto con los solventes que se utilizan habitualmente en fase reversa (metanol, acetonitrilo).

  Resulta conveniente, además, emplear "filtros químicos" que retengan a las sustancias que puedan dañar al material de relleno de la columna. Estos filtros químicos se denominan **guardacolumnas**, contienen un material de relleno similar a la columna

y actúan como barreras químicas. Asimismo tienen filtros mecánicos capaces de retener partículas.

La contaminación química del material de relleno de la columna puede eliminarse lavándola con un solvente tal que disuelva al material precipitado. Si se desconoce la identidad de la sustancia que ha producido el bloqueo, puede recurrirse a algún sistema general de lavado como el indicado por el fabricante de las columnas o como el que se detalla en la figura 13.2.

B - Pérdida de eficiencia

La pérdida de eficiencia de las columnas de HPLC es una consecuencia de su uso y, de por sí, puede no constituir un problema. El factor que debe considerarse para definirlo es el tiempo (o bien cantidad de inyecciones) transcurridos antes de que la pérdida de eficiencia sea notoria.

Habitualmente las columnas deben descartarse luego de unas 2000 ó 3000 inyecciones. Esta regla es muy general y depende fundamentalmente del tipo de separación requerida, de la naturaleza y "limpieza" de las muestras, del tipo de fase móvil empleada y del

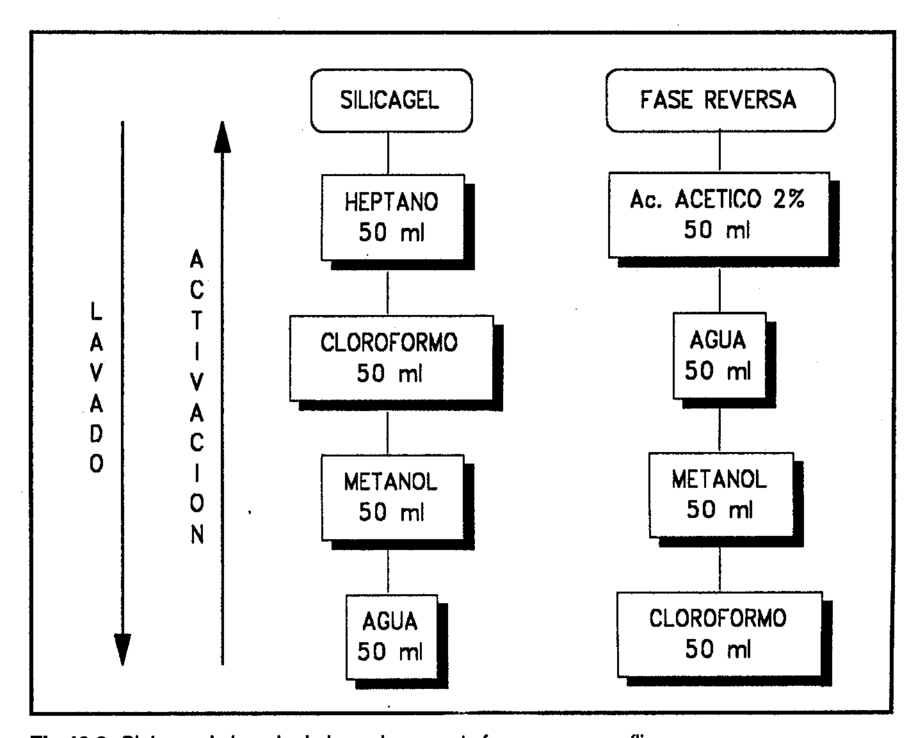


Fig 13.2 Sistema de lavado de las columnas de fase reversa y sílice

mantenimiento que se haga de la columna. Una pérdida abrupta de eficiencia constituye, sin lugar a dudas, un problema debido tal vez a la aparición de volúmenes muertos en el relleno de la columna o a la inyección de muestras con sustancias que lo contaminan. Una duración menor que la indicada exige replantear de las condiciones de operación para evaluar la factibilidad de modificarlas y, por ende, prolongar la vida útil de la columna. La pérdida de eficiencia de las columnas de HPLC puede deberse a la contaminación química (ver "Aumento en la presión") del material de relleno de la columna o a la aparición de volúmenes muertos.

Los volúmenes muertos son verdaderos espacios vacíos en una columna, que pueden presentarse tanto en el interior como en los extremos de la misma (normalmente aparecen en la cabeza). Se generan habitualmente por reacomodamientos o disolución del material de relleno y pueden solucionarse siempre y cuando se encuentren al alcance del analista, es decir, que estén ubicados en alguno de los extremos de la columna. Para hacerlo basta con abrir el extremo y rellenarlo (con la ayuda de una espátula) con algún material semejante al que contiene la columna. Si se utilizan partículas mayores a 20 μm es posible rellenarlo con el material en seco (típicamente material pelicular de unos 50 μm). En cambio si se utilizan materiales menores a 20 μm es necesario suspenderlo en fase móvil y reparar el volumen muerto con una pasta dejándola decantar después de cada agregado. Si el volumen muerto es muy importante se debe rellenarlo y luego circular fase móvil con la ayuda de la bomba varias veces hasta la desaparición total del mismo. Si al abrir la cabeza de una columna se encuentra que el material de relleno está muy contaminado (oscuro) éste puede removerse y rellenarse con material nuevo como se indicó anteriormente. En general, las columnas recuperadas de este modo no tienen su eficiencia original pero aún pueden ser útiles durante un período "extra". Como el estado de la cabeza de la columna es crucial para la separación[27], es conveniente utilizarla en el sentido inverso después de repararla. Los volúmenes muertos pueden originarse por alguno de los siguientes motivos:

- ***Cambios abruptos en la presión del sistema***

  Cambios bruscos en la presión pueden producir reacomodamientos en el material de relleno de la columna, y, consecuentemente, volúmenes muertos. Este efecto resulta más marcado en las columnas cuyos materiales de relleno tienen menores diámetros de partícula porque generan mayores presiones. Por ese motivo no se debe poner en funcionamiento la bomba en el caudal de trabajo sino que se debe llegar lentamente hasta el mismo en pasos de no más de 0.5 ml por vez.

  En algunos inyectores cuando la válvula cambia de la posición de inyección a la de carga (o viceversa) se produce un taponamiento del circuito de salida. Este taponamiento hace subir la presión del sistema y, si el cambio de la válvula no se realiza rápidamente, puede ejercer un incremento brusco en la presión y generar un volumen muerto en la columna. Por ese motivo, en los inyectores manuales resulta conveniente realizar la operación de movimiento de la válvula tan rápido como sea posible.

- ***Disolución del material de relleno de la columna***
  La disolución del material de relleno de la cabeza de la columna es otra de las causas que originan volúmenes muertos. Este fenómeno se debe a la solubilización de la sílice (soporte de base de la mayoría de las columnas de uso corriente) en fases móviles acuosas. Atwood y col[11] estudiaron este fenómeno por absorción atómica, hallando que se disuelven 38 µg/ml de sílice en agua pura y que ese valor se incrementa hasta 100 µg/ml a 60°C. Además encontraron que la solubilización se incrementa al aumentar la velocidad lineal del solvente (y su caudal) y se ve altamente favorecida a valores de pH mayores que 7.5 o altas fuerzas iónicas.
  En los casos donde es necesario utilizar alguna de esas condiciones extremas o combinaciones de ellas (sobretodo si se incluyen valores de pH de la fase móvil superiores a 7.5) es conveniente utilizar, además de la guardacolumna anteriormente mencionada, una **columna de saturación**[11,15]. Esta columna se coloca a la salida de la bomba, antes del inyector y su función es saturar con sílica la fase móvil de manera tal de evitar que disuelva al material de relleno de la columna analítica.

D - *Modificación de la retención o resolución*

La modificación de la retención de los picos es el último problema que puede relacionarse a las columnas. Esta modificación puede manifestarse como una variación en los tiempos de retención de todos los picos en el cromatograma, en tal caso la resolución puede no verse demasiado afectada, o puede verificarse en algunos picos y no en otros. En el último caso la separación entre bandas puede cambiar mejorando o empeorando la resolución. Este problema debe enfrentarse de diferente manera ya sea que se manifieste en una misma columna (e instrumento) o que ocurra al cambiar la columna por otra supuestamente equivalente. Asimismo debe considerarse si la variación es continua (deriva) alcanzando o no un valor constante, o si se producen cambios drásticos de retención. A continuación analizaremos las causas más comunes que pueden originar la modificación de la retención o la resolución.

- ***Problemas en el funcionamiento de la bomba***
  Ver "Bomba" en la sección 13.2.

- ***Deficiencias en la preparación de la fase móvil***
  Este tema ha sido discutido con anterioridad. Ver sección 4.5.

- ***Cambios en la composición de la fase móvil***
  Los cambios de composición, por evaporación del componente más volátil, producen variaciones importantes en los tiempos de retención de todos los picos en el cromatograma. Para evitar este problema basta con mantener los reservorios para fases móviles adecuadamente cerrados.

- ***Variaciones de temperatura***
  La distribución de los solutos en la fase móvil y la fase estacionaria es un equilibrio

que depende de la temperatura, por lo cual variaciones en la misma llevan a modificaciones en los tiempos de retención. Recordemos que variaciones en los tiempos de retención tienen gran influencia en las mediciones de la altura de pico, pero tienen un mínimo efecto en las mediciones por área (ver sección 10.7).
Por ese motivo resulta deseable no colocar el instrumento de HPLC en las zonas del laboratorio donde existan gradientes importantes de temperatura. Si esto último no es factible la columna debe termostatizarse.

- ***Falta de equilibrio de la fase móvil***
  La falta de equilibrio de la fase móvil conduce a derivas en los tiempos de retención de los picos en el cromatograma. Habitualmente se requieren unos 20 volúmenes de columna (unos 50 ml para columnas de 250 x 4 mm ID) para alcanzar el equilibrio, aunque existen fases móviles que requieren volúmenes mayores. Tal es el caso de las fases móviles que contienen apareantes iónicos o aminas (TEA, DEA, OA, DMOA, TMOA). Knox y Hartwick[22] reportaron que el tiempo para alcanzar el equilibrio de las fases móviles de IPC dependía de la longitud de la cadena alquílica del apareante. Para equilibrar una fase móvil con laurilsulfato de sodio necesitaron 1500 ml mientras que 100 ml fueron suficientes para una con octilsulfonato.

- ***Cambios en la superficie activa de la columna***
  La contaminación química del relleno (ver "Aumento de la presión") puede producir una superficie de selectividad diferente. Un tipo especial de contaminación puede producirse por la retención de los apareantes de cadena larga a la superficie no polar de la columna. Estos apareantes no pueden removerse completamente[22] ni siquiera utilizando solventes muy "fuertes", razón por la cual debe destinarse una columna **exclusivamente** para ese tipo de separaciones. En particular, debe cuidarse de no emplear una columna modificada para desarrollar un nuevo método de análisis. En ese caso, se corre el riesgo de no poder reproducir esa separación tal cual se la ha definido.
  Otro cambio frecuente en la superficie del material de relleno de la columna es la hidrólisis de las cadenas alquílicas unidas a los grupos silanol de la sílica. Esta hidrólisis se ve favorecida en medios acuosos y a valores de pH inferiores a 2.5.
  La hidrólisis de las cadenas alquílicas reduce la capacidad de retención en fase reversa, y aumenta la proporción de grupos silanoles libres. En consecuencia, los tiempos de retención de las sustancias básicas suelen aumentar (por la interacción con los silanoles), mientras que los correspondientes a las sustancias ácidas o neutras suelen disminuir. Un modo de subsanar este problema es adecuar la fase móvil cada vez que se la utiliza, es decir, modificar la concentración de solvente orgánico hasta conseguir la retención deseada. Con esta operación puede compensarse la pérdida de fase ligada pero no el aumento de los grupos silanoles libres en la superficie.
  Un tipo especial de modificación de las columnas de fase reversa ha sido reportada por Hammers y Verschoof[10]. Estos autores informaron que se produce una transición

irreversible de las cadenas alquílicas si se remueve el metanol abruptamente con agua y la columna se calienta seguidamente a 79°C.
En fase normal, la diferencia en la retención o la selectividad puede generarse en el contenido de agua de los solventes, pues el agua desactiva los grupos activos de la columna y modifica la separación. Una alternativa es trabajar en medio totalmente anhidro y remover el agua de la columna de sílice con el reactivo 2,2 dimetoxipropano[12] y la otra, es saturar con agua los solventes.

- ***Variabilidad en las columnas***
La variabilidad entre columnas conduce a la irreproducibilidad en la retención de los diversos solutos y se origina por las diferencias existentes en el tipo y características de la sílice que se utiliza como base del material de relleno, las condiciones en el tratamiento (sección 5.2) y el tipo de muestra a analizar. Fundamentalmente esas diferencias se deben a los silanoles libres presentes en el material de relleno y suelen ser muy marcadas de fabricante en fabricante. Varios autores[19,20] reportaron diferencias importantes en la retención de los solutos utilizando columnas de diferentes marcas.
Dependiendo del tipo de molécula a analizar y del grado con la cual ésta interactúe con los grupos silanol de la columna, la variabilidad en la retención puede aparecer también en diferentes lotes de columnas de un mismo fabricante. Esta situación puede resolverse fácilmente utilizando sistemas cromatográficos donde los silanoles no modifiquen sensiblemente a la retención (IPC, agregado de aminas a la fase móvil, utilizando altas concentraciones de buffer que supriman la disociación de los silanoles, etc) y utilizando al menos tres columnas de un mismo fabricante (entre las cuales se debe incluir una nueva y una usada) para definir las condiciones cromatográficas para realizar un ensayo.
La selectividad en las columnas conteniendo grupos amino suele ser muy diferente de fabricante en fabricante. Este hecho se fundamenta en que estas columnas pueden tener su función amino primaria, secundaria o terciaria.

Control de las Columnas de HPLC

Resulta una buena práctica cromatográfica destinar una columna determinada para cada separación y controlar las columnas periódicamente. El control de las columnas debe contener mediciones de eficiencia (ecuación 3-10), Tailing (ecuación 3-13) y resolución (ecuación 3-8). La eficiencia puede medirse como el número de platos teóricos de la columna (N), la altura de plato H (ecuación 3-9), o como la altura de plato reducida h. Nosotros preferimos utilizar la altura de plato reducida porque es un parámetro independiente de la longitud de la columna y de la granulometría del material de relleno. En la literatura[16] se encuentra una evaluación excelente de la eficiencia de las columnas de HPLC en función de este parámetro.
El valor de la eficiencia de una columna depende de la constante de tiempo (τ) del

1. Filtrar las fases móviles y las muestras
2. Remover las fases móviles conteniendo sales con agua cada vez que se opera con ellas
3. Eliminar el agua de la columna con metanol o mezclas de metanol con agua
4. Circular periódicamente un solvente fuerte, por ejemplo metanol, para remover las sustancias excesivamente retenidas
5. Realizar la última operación diariamente si las muestras son muy "sucias"
6. Destinar una columna para cada tipo de muestra
7. Diseñar procedimientos para la preparación de las muestras que aíslen al analito de las sustancias que pueden contaminar a las columnas
8. Utilizar filtros precolumna
9. Utilizar guardacolumnas para muestras muy "sucias"
10. Utilizar columnas de saturación si la fase móvil es nociva para el material de relleno de la columna
11. Cambiar el caudal en pasos no mayores a 0.5 ml/min
12. Accionar rápidamente las válvulas manuales de inyección
13. Para columnas de base sílice, mantener el valor de pH de la fase móvil entre 2.5 y 7.5
14. No utilizar temperaturas que superen los 60 °C con columna de base sílice
15. Disolver las muestras en la misma fase móvil
16. Si se utilizan altas temperaturas, enfriar la columna en forma gradual y con solvente fluyendo
17. Preferentemente, mantener la columna en posición vertical

Tabla 13.IX Consejos útiles para el buen mantenimiento de las columnas de HPLC

detector[17,18]; siendo el tiempo requerido para que la señal alcance el 63.2 % su valor final (1/5 del tiempo de respuesta). Para calcular la eficiencia exactamente se debe extrapolar su valor a constante de tiempo cero, o bien operar en una zona del cromatograma donde el efecto de la constante de tiempo en la dispersión de la banda sea mínimo (k'= 5 - 6). El control de las columnas debe realizarse diariamente utilizando la muestra para la cual la columna ha sido destinada con el fin de dilucidar si la separación obtenida es adecuada para la cuantificación **(Ensayo de Adecuación Cromatográfico)**, y periódicamente con alguna separación tipo para comparar el comportamiento de columnas similares.

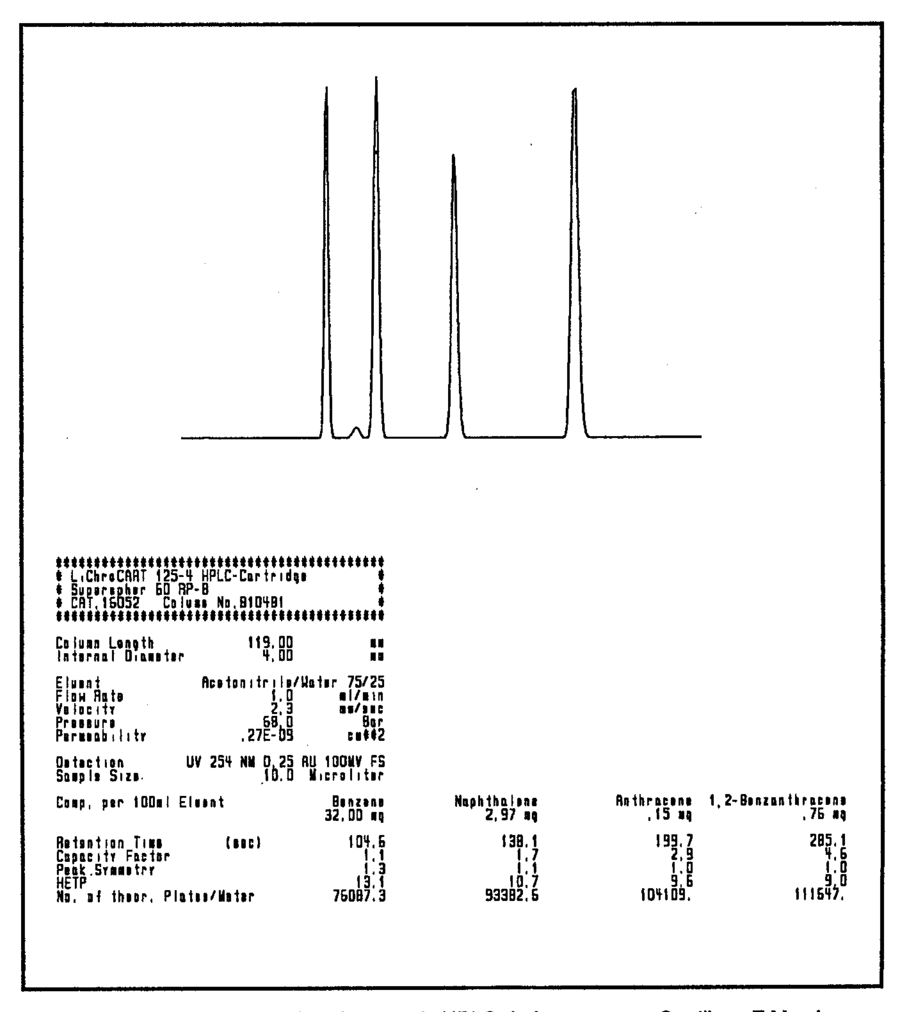


Fig 13.3 Sistema de control de columnas de HPLC de fase reversa. Gentileza E.Merck

Como separación tipo puede utilizarse la separación provista por el fabricante de las columnas (figura 13.3), o alguna de las separaciones indicadas como referencia en la literatura. Para el control de las columnas de fase reversa Dolan y Snyder[2] sugieren la utilización de una mezcla de uracilo, fenol, acetofenona, nitrobenceno, benzoato de metilo, anisol y tolueno, mientras que Chen y Weber[21] sugieren la utilización de metil, etil, propil y butil p-hidroxibenzoatos con tartrazina como indicador del volumen muerto. Los criterios de aceptación para cada uno de los parámetros a medir se encuentran en la tabla 13.X.

13-4 Problemas Cromatográficos

En la sección precedente hemos enfocado nuestra atención en los problemas relacionados con el equipo cromatográfico. En ésta nos dedicaremos específicamente al cromatograma, indicando las dificultades y los problemas que con él pueden presentarse de manera tal de ofrecer al lector una guía de ayuda para resolverlos en el futuro.
Nos dedicaremos, especialmente, a los problemas que redundan en la deformación de los picos cromatográficos (figura 13.4) y a las anormalidades referidas al cromatograma (aparición de picos extraños, ruido o deriva de la línea de base).

FACTOR	**CRITERIOS DE ACEPTACION**	
	Muestra control	**Muestra de rutina**
Tailing[1]	$\leq$ 1.5	$\leq$ 2.0
Resolución	$\geq$ 1.5	$\geq$ 1.5
Altura de plato reducida[2]	1) $\leq$ 3dp Columna Buena 4dp $\leq$ h $\leq$ 5dp Aceptable $\geq$ 6dp Columna muy deteriorada	
	2) Medir la eficiencia de acuerdo a lo indicado por el fabricante y descartar la columna cuando la eficiencia llegue al 50 % de su valor inicial	

Tabla 13.X Parámetros para el control de las columnas cromatográficas. (1) medido al 5% de la altura. (2) h se calcula dividiendo la altura equivalente a un plato teórico (H) por el tamaño de partículas de material de relleno de la columna.

La deformación del pico cromatográfico es un hecho muy importante porque habitualmente se traduce en pérdidas de resolución o defectos en la cuantificación. La identificación de este problema puede resultar de la apreciación visual del pico en el cromatograma, de la medición del tailing, o de la eficiencia tanto durante el control periódico de las columnas como en los análisis de rutina. La aparición de estos fenómenos durante el desarrollo de un nuevo método de análisis es una condición necesaria y suficiente para que la nueva metodología deba replantearse y, eventualmente, descartarse.

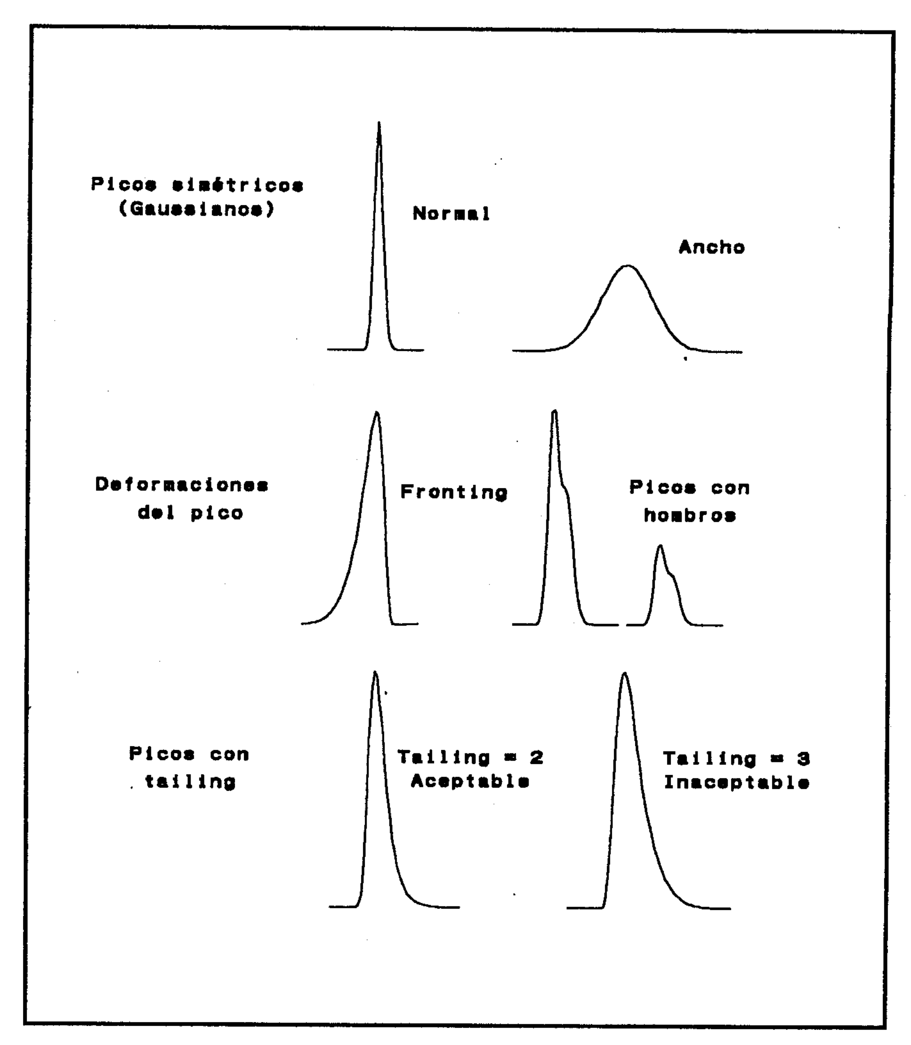


Fig 13.4 Pico simétrico y deformaciones habituales de los picos cromatográficos

Derivas de la línea de base

Las derivas, conjuntamente con otros problemas relacionados con la línea de base, se pueden visualizar en la figura 13.5, y las causas más comunes que las originan se encuentran detalladas, junto con sus soluciones, en la tabla 13.IV, punto 17. La aparición de derivas dificulta la definición de la base del pico resultando, así, en errores más o menos severos en la cuantificación.

Defectos en la desgasificación o presencia de impurezas en las fases móviles son las causas, relacionadas con los solventes, que producen derivas en la línea de base. Ambas han sido tratadas anteriormente (secciones 4.3, 4.4 y 4.5).

Otra de las causas que la producen se refiere al lento equilibrio de la columna cromatográfica, este tema también ha sido detallado con anterioridad (ver "Columnas: Falta de equilibrio en la fase móvil").

Las derivas pueden originarse, además, cuando la columna libera componentes excesivamente retenidos. Estos componentes suelen eluir como bandas muy anchas que se confunden con las variaciones propias de la línea de base y pueden provenir de la muestra o de la misma columna cromatográfica. En el primer caso es posible esperar la elución del pico tardío antes de inyectar una segunda muestra o, preferentemente, diseñar algún procedimiento de preparación que aísle al componente excesivamente retenido. En el

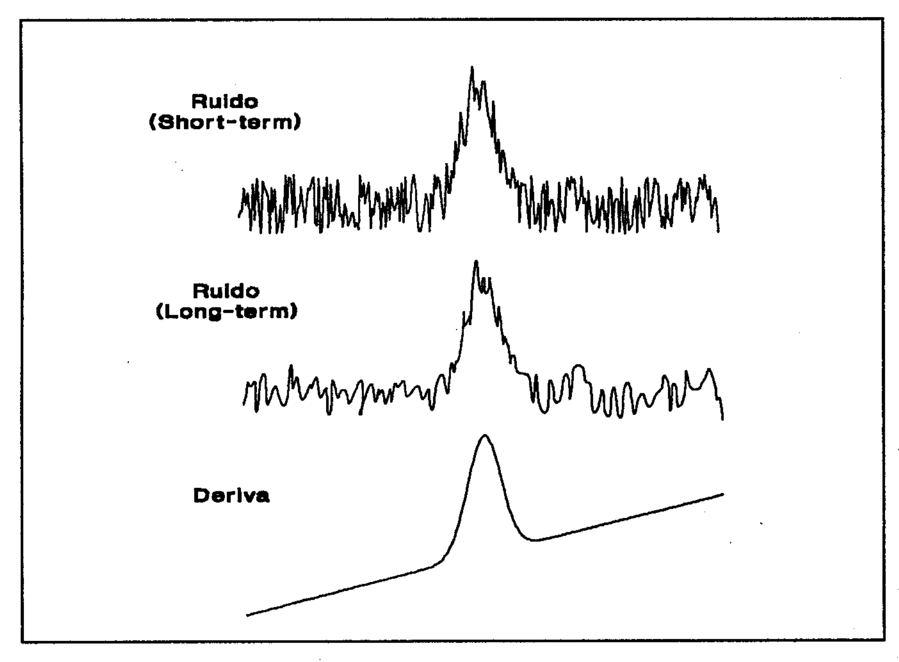


Fig. 13.5 Ruido y deriva de la señal cromatográfica.

segundo caso se trata de columnas en las cuales han quedado retenidas impurezas presentes tanto en los solventes como en las muestras que eluyen lentamente. Este último problema puede evitarse lavando diariamente la columna (o cuando se inyectan muestras muy "sucias") con un solvente fuerte (metanol, acetonitrilo).

Ruido

El ruido es otro de los problemas que afectan a la cuantificación porque dificulta la definición de la base del pico. En HPLC el ruido, como la deriva, puede provenir de orígenes sumamente diversos. En primera aproximación cualquier factor que atente contra la estabilidad en el caudal de la fase móvil o contra la energía en la detección será un factor que contribuya a la aparición de ruido en el instrumento. Las causas que originan el ruido conjuntamente con sus posibles soluciones se detallan en la tabla 13.IV, punto 18.

Tailing

Para obtener resultados cuantitativamente válidos es necesario trabajar sobre "buenos" cromatogramas. Es decir, sobre picos simétricos (Gaussianos) bien separados ($R \geq 1.5$). Cualquier factor que atente o bien contra la simetría de los picos, o bien contra su separación desfavorecerá, sin lugar a dudas, su cuantificación. Los tipos más comunes de deformaciones y asimetrías en los picos se ejemplifican en la figura 13.4.

El tailing (ecuación 3.13) es una de las deformaciones del pico más frecuentes. Es interesante destacar que los picos con tailing son difíciles para integrar aún con los instrumentos más modernos y sofisticados, y que la presencia de tailing reduce sustancialmente la resolución entre los mismos.

Por otro lado, la completa ausencia de asimetrías es un hecho bastante poco habitual. El grado de asimetría que puede tolerarse tanto para las determinaciones rutinarias del laboratorio como en el control de las columnas se detalla en la tabla 13.X y las causas más comunes que originan tailing se detallan en la tabla 13.XI. El primer punto de la tabla ha sido detallado anteriormente (ver "Columnas") y los puntos subsiguientes serán tratados en esta sección.

Picos anchos

La presencia de picos anchos es, al igual que el tailing, un fenómeno que se origina en algún problema de índole cromatográfica. Estos picos pueden ser perfectamente simétricos, por lo cual no presentan demasiados problemas de integración, pero debido a la extensión de su base, pueden presentar problemas de resolución si se encuentran relativamente próximos.

Las mismas causas que originan picos con tailing (ver tabla 13.XI) pueden generar picos

anchos. Estos problemas junto con sus posibles soluciones serán discutidos más adelante en esta sección. Cuando se observa un pico ancho también debe considerarse la posible existencia de algún pico no resuelto completamente. Así, Bowers y Mathews[25] descubrieron que el pico ancho que obtenían en el análisis por HPLC de una ciclosporina no era tal, sino que se debía a la presencia de isómeros conformacionales parcialmente resueltos. La presencia de picos anchos o de picos con tailing en SEC difícilmente se relacione con la existencia de un problema pues, en este modo cromatográfico, la dispersión de la banda (y su asimetría) se refiere a la dispersión (o asimetrías en la dispersión) de pesos moleculares del polímero en cuestión.

La eficiencia de la columna debe medirse cada vez que se efectúe un análisis sobre la misma muestra que se desea cuantificar. Si se determina que los picos tienen un ancho fuera de lo normal (es decir que la eficiencia de la columna ha disminuido) es conveniente replantear la metodología en función de la resolución obtenida y la resolución mínima requerida para una buena cuantificación. De esta manera es posible dilucidar si se puede analizar las muestras con la misma columna o si es necesario cambiarla.

Efectos extracolumnares

Habitualmente cuando se mide la eficiencia en un cromatograma que contiene varios picos se encuentra que el número de platos teóricos de la columna parece "aumentar"

1. Defectos en la columna cromatográfica Volúmenes muertos Contaminación Química
2. Efectos extracolumnares Celda del detector demasiado grande Tuberías con ID o longitud inadecuadas Volumen de inyección demasiado grande
3. Efectos de solvente
4. Sobrecarga de la columna
5. Mecanismos mixtos de retención
6. Sitios heterogéneos de retención
7. Sistemas no buffereados

Tabla 13.XI Causas más comunes que producen tailing en los picos

cuando aumenta el tiempo de retención hasta que alcanza un valor aproximadamente constante. Este fenómeno experimental no está de acuerdo con la definición de la eficiencia que indica que el número de platos teóricos de una columna debe ser constante para un sistema determinado. Esta discrepancia se debe a los efectos extracolumnares.
Los efectos extracolumnares son ensanchamientos de la banda cromatográfica no adjudicables a la columna, sino al resto del instrumento. Debido su aditividad (ecuación 3.23) estos efectos son poco importantes cuando la dispersión debida a la columna es grande pero comienzan a tener influencia cuando la dispersión debida a la columna es baja. La teoría del ensanchamiento de la banda cromatográfica puede encontrarse en la literatura[28]. La dispersión debida a la columna puede calcularse como[23]:

$$W_{95} = \frac{4\,(1 + k')\,V_0}{\sqrt{N}} \qquad (13\text{-}1)$$

Donde W_{95} es la dispersión de la banda debida a la columna. De la ecuación 13-1 puede deducirse que los efectos extracolumnares tendrán mayor magnitud cuando k' es pequeño (tiempos de retención cortos), V_0 es pequeño (columnas más cortas o de ID menor) y cuando N es grande.
Erni[26] ha estudiado la influencia de los efectos extracolumnares en distintos modos de trabajo en HPLC a los cuales clasificó de la siguiente manera: **convencional** (t_0 = 1 min), **de alta velocidad** (High Speed, t_0 = 10s), y **de súper velocidad** (Super Speed, t_0 = 1s). Los mayores problemas aparecen, obviamente, en los dos últimos.
La influencia de los efectos extracolumnares puede detectarse cuando se utilizan columnas cortas en equipos diseñados hace algunos años. Estos instrumentos estaban preparados para operar con columnas de 25-30 cm x 4 mm ID y dp 10 µm, mientras que actualmente se utilizan columnas más cortas o de menor diámetro interno. Estas columnas producen dispersiones de la banda cromatográfica mucho menores por lo cual los efectos extracolumnares se hacen más manifiestos. Estos efectos producen un aumento de N al incrementarse el tiempo de retención, y un tailing más pronunciado de los picos tempranos comparado con los picos tardíos. La necesidad de corregirlos está dada por la deformación que presenten los picos a analizar.
En los casos donde los efectos extracolumnares produzcan deformaciones severas de los picos a cuantificar, es posible o bien operar con otro instrumento que no posea ese inconveniente, o bien intentar reducirlos en el instrumento original. Si se opta por la segunda opción se debe verificar que se utilice sólo la longitud de tubería (preferentemente de 0.18 en lugar de 0.22 mm ID) estrictamente necesaria para la conexión, y que la celda del detector tenga un volumen pequeño. Los efectos extracolumnares en las tuberías del instrumento de HPLC han sido estudiados por Atwood y Golay[33]. Habitualmente las tuberías no son las partes del instrumento que crean mayores problemas al respecto sino que es la celda del detector la que produce mayor dispersión en la banda cromatográfica. Desafortunadamente las celdas de menores capacidades tienen caminos ópticos menores,

y la sensibilidad se ve reducida.

Otro de los factores que contribuye al ensanchamiento de banda extracolumnar es el volumen de inyección[27] si las muestras están disueltas en fase móvil o en un solvente "más fuerte" que la fase móvil. En estos casos el volumen de inyección debe mantenerse tan pequeño como sea posible y no superar las cantidades indicadas anteriormente para cada tipo de columna (sección 10.4). En cambio suelen inyectarse volúmenes mucho mayores (hasta 5 veces los indicados) si, para disolver las muestras, se utiliza un solvente "más débil" que la fase móvil. En este último caso la presencia del solvente débil favorece la concentración de los componentes de la muestra en la cabeza de la columna, y finalmente, estos componentes eluyen a través de la columna cuando la fase móvil reemplaza al solvente de disolución de la muestra. Adicionalmente, la constante de tiempo del detector puede tener un efecto muy marcado en el ancho de los picos.

En la literatura se han reportado varias metodologías más o menos complejas para medir el ensanchamiento de banda instrumental[29-31], aunque, a fines prácticos puede medirse simplemente el ancho del pico que resulta de la inyección de una sustancia que produzca una señal medible en el instrumento sin columna[1,32].

Efectos de solvente

Como ya hemos mencionado anteriormente, para evitar problemas posteriores es conveniente que la muestra se disuelva en la misma fase móvil. Por motivos de solubilidad del analito muchas veces ésto no es posible y se recurre a solventes "más fuertes" que la fase móvil para lograr su total disolución. Al inyectar estas soluciones en el equipo de HPLC se produce una deformación de los picos cromatográficos que desaparece completamente cuando la muestra se disuelve en fase móvil. En las figuras 13.6 y 13.7 se ejemplifican dos casos donde se han manifestado estos efectos de solvente.

Para detectar su presencia durante el desarrollo de los métodos de análisis es recomendable inyectar la muestra disuelta en el solvente seleccionado para la cuantificación y comparar el perfil del pico obtenido con el perfil del mismo pico en una solución preparada con la misma concentración de analito disuelto en fase móvil.

La corrección de este problema es muy sencilla: la solución a inyectar debe estar preparada en fase móvil o en un solvente tan semejante a la fase móvil como sea posible, o se debe reducir el volumen de inyección.

Sobrecarga de la columna

Cuando se inyectan grandes masas de muestra, y se observa una deformación de los picos (ya sea por la presencia de tailing o por la aparición de picos anchos deformados) conjuntamente con una disminución de los tiempos de retención respecto de muestras más diluidas estamos frente a un problema de saturación de la columna denominado

sobrecarga. Este efecto se debe a que altas concentraciones pueden superar el rango lineal de la isoterma de distribución del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria . La solución es muy sencilla, simplemente se diluye la muestra hasta entrar en la zona lineal de la isoterma.

La sobrecarga era una situación muy común hace unos 15 años cuando se utilizaban columnas con materiales peliculares, porque estos materiales poseen muy baja capacidad de carga, pero ha dejado de serlo con el advenimiento de las columnas de pequeñas partículas porosas, típicamente de 5 y 10 µm de diámetro.

Además, difícilmente nos encontremos con este problema debido a que, en el caso del detector UV, en general se sobresatura el detector antes de sobresaturarse la columna.

La sobrecarga de la columna es un fenómeno que suele aparecer en la cromatografía IPC. En este caso en particular se puede disminuir la concentración de la muestra o aumentar la "capacidad" de la columna. Para hacerlo basta con agregar mayores concentraciones de apareante a la fase móvil.

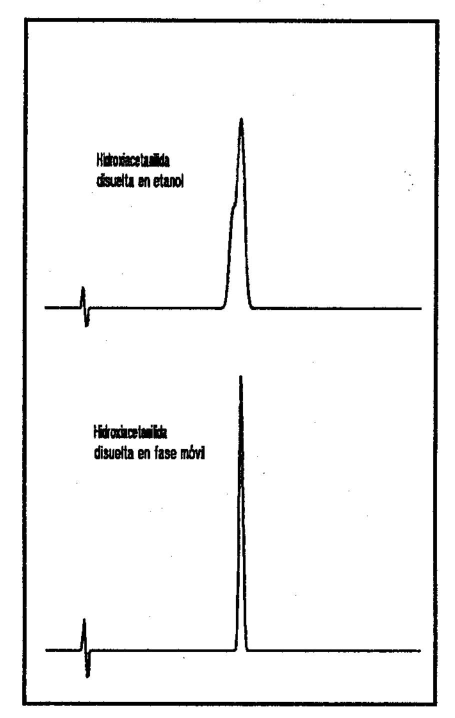


Fig 13.6 Efectos de solvente. Cromatogramas de hidroxiacetanilida en fase reversa con acetonitrilo: buffer fosfato como fase móvil.

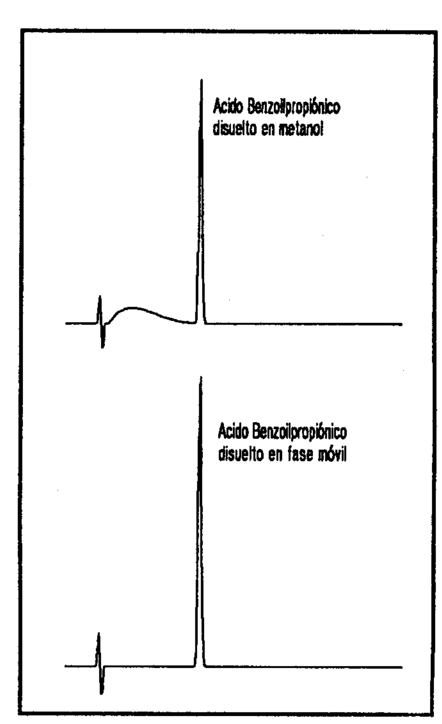


Fig 13.7 Efectos de solvente. Cromatogramas del ácido benzoilpropiónico en fase reversa con metanol:buffer fosfato como fase móvil

Mecanismos mixtos de retención

La presencia de mecanismos mixtos de retención es, probablemente, el inconveniente más severo que deben enfrentar los analistas en la actualidad. Este efecto se manifiesta como asimetrías más o menos importantes en los picos de los componentes que presentan interacción mientras que los que no lo hacen suelen dar picos perfectamente simétricos. Es así que, en un mismo cromatograma, suelen encontrarse picos simétricos y asimétricos. La diferencia con los efectos extracolumnares reside en que en estos últimos los picos más asimétricos son los que eluyen a bajos valores de k' mientras que cuando existen mecanismos mixtos de retención la asimetría puede darse en cualquier zona del cromatograma. Si se trabaja con familias de compuestos que presenten el mismo tipo de interacción se puede observar que el tailing es más pronunciado en los picos que eluyen con valores de k' elevados.

Los mecanismos mixtos de retención suelen aparecer en los casos donde la naturaleza del material de relleno de la columna induce a la retención de ciertos solutos por más de un mecanismo. En fase reversa los responsables de este tipo de fenómeno son los grupos silanol sin recubrir de la columna. Estos grupos, si están disociados, pueden interactuar con sustancias básicas protonadas por mecanismos de intercambio iónico[35,36,] o por enlaces de puente de hidrógeno.

La concentración de grupos silanol en superficie tiene un efecto importante en la retención. Se ha demostrado[34] que la retención de solutos no polares aumenta cuando aumenta el recubrimiento final de la columna (es decir, cuando disminuyen sus grupos silanol). Dolan y Snyder[1] sugieren que pueden existir varios tipos diferentes de grupos silanol, y que alguno de ellos es capaz de interactuar también con moléculas ácidas por enlaces de hidrógeno ya sea por interacción con los grupos silanol disociados o sin disociar.

La diferencia entre los mecanismos mixtos y la heterogeneidad en los sitios de retención reside, fundamentalmente, en que en el primer caso la actividad de la fase estacionaria es baja (BPC, LLC, SEC) mientras que en el segundo (LSC, IEC) es alta. De todas maneras esta separación no es muy rígida y suelen darse ejemplos cruzados.

Los mecanismos mixtos (es decir la cantidad y tipo de silanoles libres del material de relleno de la columna) son, generalmente, los responsables de las diferencias encontradas en columnas supuestamente equivalentes de diferentes fabricantes y, aún, en columnas de diferente lote de un mismo fabricante.

La solución a este problema consiste en desarrollar los métodos de análisis de manera tal de minimizar estos efectos. En principio si se desea evitar el intercambio iónico con los grupos silanoles, hecho que probablemente sea el más frecuentemente encontrado, se debe bloquear de algún modo su capacidad de intercambio, por ejemplo:

- Disminuyendo el valor de pH de la fase móvil por debajo de 3, o preferentemente de 2 de manera tal de suprimir la disociación de los grupos silanol. De hecho, ésta es la modalidad de preferencia cuando se analizan péptidos o proteinas pequeñas que

posean aminoácidos básicos que puedan actuar con los silanoles de la columna. El problema, en este caso, resulta ser la baja estabilidad de la fase ligada al disminuir el pH de la fase móvil[37].

- Utilizando fases móviles buffereadas con altas concentraciones de buffer. Se ha reportado[35,36] que el agregado de buffers a las fases móviles reduce el efecto silanofílico que presentan los solutos básicos.

- Bloqueando a los silanoles libres de la columna con el agregado de una base (TEA o aminas en general) a la fase móvil. Varios autores[38-40] han reportado que la utilización de aminas en la fase móvil mejora la asimetría de sustancias básicas.

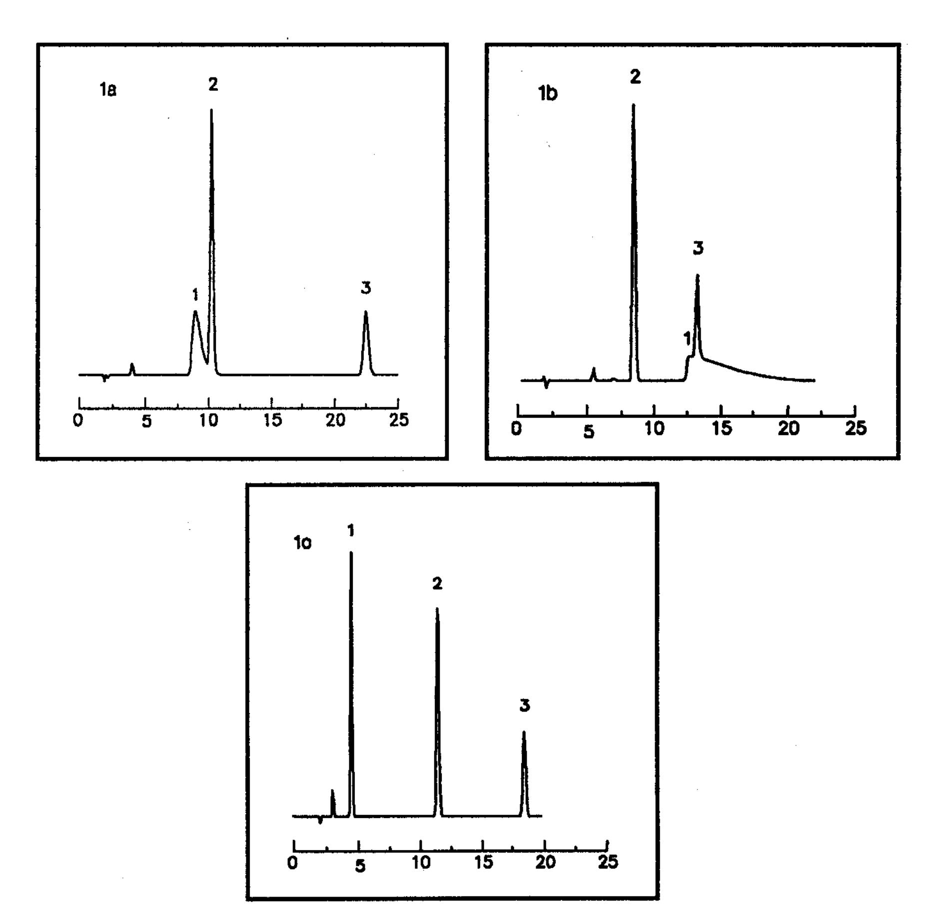


Fig 13.9 Efecto de la presencia de grupos silanoles libres en la separación de Difenhidramina 5-(metilfenil) 5-fenil hidantoína y diazepam. Fase móvil: AcN: Buffer pH 2,3 (312:680). Columnas: 1a) 1b) columnas con interacciones de superficie inadecuada. 1c) columna RP Select B. Gentileza E. Merck

- Utilizando columnas que posean altos recubrimientos superficiales y bajos contenidos de silanoles. (figura 13.9)

Sitios heterogéneos de retención

Las asimetrías generadas por la presencia de sitios secundarios de retención se manifiestan en los materiales de relleno de las columnas que poseen sitios muy activos de fuerte retención y afinidad conjuntamente con sitios débiles de baja retención y afinidad. Cuando la concentración de muestra es baja, el analito interactúa preferentemente con los sitios fuertes, al aumentar la concentración estos sitios se sobrecargan y conducen a la aparición de tailing. Este fenómeno suele darse en las columnas de IEC y LSC.
Para evitar la heterogeneidad de sitios que presenta la sílice en LSC se suele desactivar parcialmente el material de relleno de la columna con el agregado de un componente polar (agua, etanol, isopropanol) a la fase móvil.

Sistemas no buffereados

Otro de los problemas que conduce a la aparición de asimetrías en los picos es la ausencia de sistemas buffereados cuando las sustancias a analizar están parcialmente ionizadas en el valor de pH seleccionado para la separación. La retención de los solutos ionizables depende del valor de pH de la fase móvil: en fase reversa los solutos no ionizados se retienen más favorablemente que los solutos ionizados. Es decir que el pH de la fase móvil es un verdadero "motor" de la retención de solutos ionizables. Cuando la sustancia en cuestión se encuentra parcialmente disociada se produce una modificación del pH en la columna (por efecto de la misma disociación) y, consecuentemente, la presencia de las dos formas (ionizada y no ionizada) conduce a la aparición de tailing. Este efecto es mucho más marcado cuando el valor del pH de la fase móvil se aproxima al valor del pK del analito en cuestión.
El agregado de buffers a las fases móviles ayuda a evitar este problema, por lo cual la utilización de fases móviles buffereadas se ha transformado en un "deber" que ningún analista debe evitar al analizar sustancias disociables.

Picos negativos

En HPLC los picos negativos tienen significados muy diferentes de acuerdo al detector empleado. Así, utilizando un detector de índice de refracción puede suceder que la presencia de analito incremente el RI del solvente puro, en tal caso se obtiene un pico positivo, o que lo disminuya, en tal caso se obtiene un pico negativo. Utilizando un detector UV, la presencia de picos negativos puede asociarse a diferencias en la absorción o en el índice de refracción entre los componentes de la fase móvil y la muestra, y, en

muchos casos puede constituir un problema. Así, por ejemplo, si el pico negativo se encuentra relativamente próximo al pico de analito es posible que dificulte el trazado de la línea de base, y consecuentemente, la integración del mismo (ver figura 10.2).

Si el solvente seleccionado para la disolución de las muestras absorbe más que la fase móvil a la longitud de onda de trabajo, entonces, se producirá un pico negativo en la zona del cromatograma donde eluye el solvente (típicamente en el volumen muerto). Otro de las causas que originan la presencia de un pico negativo en V_0 reside en las diferencias existentes entre el índice de refracción de la fase móvil y el solvente de disolución de las muestras.

En cambio, supongamos que la fase móvil contiene una impureza que absorbe luz UV y eluye a un tiempo de retención tr_i. Al inyectar un solvente puro (es decir libre de esa impureza) se va a producir una zona "vacía" dentro de la columna que va a migrar al mismo tiempo de retención que el componente i. Como resultado se obtiene un pico negativo a tr_i. Persson y col[38] reportaron la aparición de picos negativos asociados a impurezas presentes en la DMOA y la TMOA utilizadas en la preparación de las fases móviles.

El modo de evitar la aparición de picos negativos consiste en utilizar fases móviles preparadas con reactivos de un excelente grado de pureza y disolver a las muestras en la misma fase móvil.

Referencias

1. Dolan J.W. and Snyder L.R.,"Troubleshooting of LC Systems", Humana Press, NJ (1989)
2. Merrill J.C, Am Lab, Oct (1987)
3. Walker J.Q., Jackson M.T. and Maynard J.B.," Chromatographic Systems: Maintenance and Troubleshooting". Academic Press, NY (1977)
4. Runser D.J.,"Maintaining and Troubleshooting HPLC Systems" J. Wiley and Sons, NY (1981)
5. Snyder L.R. and Kirkland J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2nd Ed. Chapter 19, Wiley Interscience. J. Wiley and sons, NY (1979)
6. Dolan J.W., LC-GC 9, 406, (1991)
7. Dolan J.W., LC-GC 1, 542, (1983)
8. Dolan J.W., LC-GC 2, 583, (1984)
9. Rabel F.M,. J of Chrom Sci 18, 394, (1980)
10. Hammers W.E. and Verschoor P.B.A., J of Chrom 282, 41, (1983)
11. Atwood J.C., Schmidt G.J. and Slavin W., J of Chrom 171, 109, (1979)
12. Bredeweg R.A., Rothman L.O and Pfeiffer C.D. Anal Chem 51, 2061, (1979)
13. Dolan J.W. and Berry V.V., LC 2 ,470 ,(1983)
14. Dolan J.W. and Berry V.V., LC 2, 78, (1984)
15. Rabel F.M. Am Lab 12, 81 (1980)
16. Stout R.W., De Stefano J.J. and Snyder L.R., J of Chrom 282 263, (1983)
17. Low G.K. and Haddad P.R., J of Chrom 198, 235, (1980)
18. Higgins J.W., J of Chrom 148, 335, (1978)
19. Ogan K. and Katz E., J of Chrom 188, 115, (1980)
20. Nice E.C., O'Hare M.J., J of Chrom 166, 263, (1978)
21. Chen J.C. and Weber S., J of Chrom 248, 434, (1982)
22. Knox J.H. and Hartwick A.A., J of Chrom 204, 3, (1981)
23. Dicesare J.L., Dong M.W., and Atwood J.G., J of Chrom 217 ,369, (1981)
24. Huber J.B.K. and Gerrritze R.G., J of Chrom 58 , 137, (1971)
25. Bowers L. and Mathews S.E., J of Chrom 333 , 231, (1985)
26. Erni F., J of Chrom 282, 371,(1983)
27. Colin H., Martin H. and Guiochon G., J of Chrom 185, 79,(1979)
28. Knox J.H. and Pryde A., J of Chrom 112, 171, (1975)

29. Reese C.E. and Scott R.P.W., J of Chrom Sci 18, 479, (1980)
30. Grushka E., Anal Chem 44, 1733, (1972)
31. Kutner W., Dewoski J. and Kemula W., J of Chrom 218,45, (1981)
32. Huber J.F.K., J of Chrom Sci 7, 172, (1969)
33. Atwood J.G. and Golay M.J.E., J of Chrom 218, 97, (1981)
34. Karch K., Sebestian I. and Halasz I., J of Chrom 122 , 2, (1976)
35. Vigh Gy and Papp E., J of Chrom 282, 59, (1983)
36. Vigh Gy and Papp E. J of Chrom 259, 49, (1983)
37. Glach J.L., Kirkland J.J. and Köhler J., J of Chrom 384 81, (1987)
38. Persson B.A., Jansson S.O. and Johansson M.L., J of Chrom 316 291, (1984)
39. Melander W., Stoveken J. and Hórvath S., J of Chrom 199, 35, (1980)
40. Gill R., Alexander S.P., Moffat A.C., J of Chrom 247, 39, (1982)

Glosario

α	Factor de Separación
ACS-SEAC	American Chemical Society - Subcommitee on Environmental Analtytical Chemistry
ASTM	American Society for Testing and Materials
AUFS	Unidades de Absorbancia a Escala Completa (Absorbance Units Full Scale)
AcN	Acetonitrilo
Angstrom	Angstrom (10E-10 m)
As	Factor de Asimetría (calculado al 5 o al 10 % de la altura)
BHT	Butilhidroxitolueno
BPC	Cromatografía de Fase Ligada (Bonded Phase Chromatography)
COF	Factor de Optimización Cromatográfica (Cromatographic Optimization Factor)
D	Dispersidad o Polidispersidad
DEA	Dietilamina
DEAE	Grupo Dietil aminoetil
DMP	Dimetoxipropano
DMSO	Dimetilsulfóxido
dp	Diámetro de partícula (en general en m)
EDTA	Acido etilén diamino tetraacético
ε	Fuerza del solvente en LSC
FC-113	1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoretano
fem	Fuerza electromotriz
γ	Coeficiente de actividad
GC	Cromatografía Gaseosa (Gas Chromatography)
GFC	Cromatografía de Filtración por Gel (Gel Filtration Chromatography)
GLC	Cromatografía Gas-Líquido (Gas-Liquid Chromatography)
GPC	Cromatografía de Permeación por Gel (Gel Permeation Chromatography)

H	Altura equivalente de un Plato Teórico
HEPT	Altura equivalente de un Plato Teórico (Heigh Equivalent to a Theoretical Plate)
HIC	Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (Hidrofobic Interaction Chromatography)
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Performance (High Performance Chromatography)
I	Fuerza Iónica
IEC	Cromatografía de Intercambio Iónico (Ion Exchange Chromatography)
IPA	Isopropilamina
IPC	Cromatografía de Apareamiento Iónico (Ion Pair Chromatography)
IUPAC	International Union Of Pure and Applied Chemistry
k'	Factor de Capacidad
L	Longitud de la columna (en general en cm)
LC	Cromatografía Líquida (Liquid Chromatography)
LLC	Cromatografía Líquido-Líquido (de Partición, Liquid-Liquid Chromatography)
LSC	Cromatografía Líquido-Sólido (de Adsorción,Liquid-Solid Chromatography)
λ	Longitud de onda (en general en nm)
MTBE	Metil Tercbutil Eter
MeOH	Metanol
Mn	Número Molecular Medio o Peso Molecular Medio Numérico
Mw	Peso Molecular Medio Ponderal
Mz	Peso Molecular Medio de Centrifugación
N	Número de Platos Teóricos
NP o NPLC	Cromatografía Líquida en Fase Normal (Normal Phase Chromatography)
ODS	Octadecilsilano
pKa	Logaritmo negativo de la constante de acidez
psi	Libras por Pulgada Cuadrada (Pound per Square Inch)
PTFE	Politetrafluoretileno o Teflon®
R	Resolución (entre dos picos cromatográficos)
RP o RPLC	Cromatografía Líquida en Fase Reversa (Reversed Phase Chromatography)
σ	Desviación Estándar

RSD	Desviación Estándar Relativa (Relative Standard Deviation)
SAX	Intercambiador aniónico fuerte (Strong anion Exchanger)
SCIC	Cromatografía Iónica en Columna Unica (Single Column Ion Chromatography)
SCX	Intercambiador catiónico fuerte (Strong cation Exchanger)
SEC	Cromatografía de Exclusión por Tamaño (Size Exclusion Chromatography)
SFC	Cromatografía de Fluídos Supercríticos (Supercritical Fluid Chromatography)
Switching	Técnica de desvío del caudal por medio de válvulas
TBA	Tetrabutilamonio
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en Capa Delgada (Thin Layer Chromatography)
Tailing	Asimetría
t_o	Tiempo de elución del volumen muerto
t_r	Tiempo de elución del analito
u	Velocidad lineal (en general en cm/seg)
UV	Ultravioleta
V_o	Volumen Muerto
V_r o V_e	Volumen de elución del analito
WAX	Intercambiador aniónico débil (Weak anion Exchanger)
WCX	Intercambiador cantiónico débil (Weak cation Exchanger)
w	Ancho de pico
w_h	Ancho de pico a media onda
w_{tan}	Ancho de pico tomado por extrapolación a la línea de b
η	Viscosidad (en general en centipoise -cps-)

Indice alfabético